

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II , Klinikum der Justus-Liebig  
Universität Gießen

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus - Liebig - Universität Gießen

Experimentelle Untersuchungen zur  
Mikrozirkulation isoliert perfundierter  
Rattenherzen unter Einfluß  
bakterieller Exotoxine

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Eingereicht von  
ULRICH BENNEMANN

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II , Klinikum der Justus-Liebig  
Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus - Liebig - Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Diener

Experimentelle Untersuchungen zur  
Mikrozirkulation isoliert perfundierter  
Rattenherzen unter Einfluß  
bakterieller Exotoxine

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Eingereicht von  
**ULRICH BENNEMANN**  
Tierarzt aus Hameln

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 07.01.2002

Meinen Eltern

Ulrike und Dr. Hans Jürgen Bennemann

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>VORWORT</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
3.1	<b>Klinik und Pathophysiologie der Sepsis</b>	<b>4</b>
3.2	<b>Das Krankheitsbild „Septische Kardiomyopathie“</b>	<b>6</b>
3.3	<b>Mögliche Ursachen der septischen Kardiomyopathie</b>	<b>7</b>
3.3.1	Zytokine als Myocardial Depressant Substances	8
3.3.2	Mikrozirkulationsstörungen	9
3.4	<b>Vasoaktive Mediatoren in der Sepsis</b>	<b>10</b>
3.4.1	Plättchen Aktivierender Faktor, Endothelin, Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor und Stickstoffmonoxid	11
3.4.2	Arachidonsäuremetabolite	13
3.5	<b>Bedeutung bakterieller Pathogenitätsfaktoren bei der Pathogenese der Sepsis und der septischen Kardiomyopathie</b>	<b>14</b>
3.5.1	Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäuren	15
3.5.2	Porenbildende bakterielle Exotoxine	16
3.6	<b>Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>21</b>
4.1	<b>Material</b>	<b>21</b>
4.1.1	Tiere	21
4.1.2	<i>Escherichia coli</i> Hämolyysin und <i>Staphylococcus aureus</i> $\alpha$ -Toxin	21
4.1.3	Pharmaka	21
4.1.4	Material und Geräte für die Organperfusion	22
4.1.5	Mikrosphären	22
4.1.6	Substanzen und Geräte für die Aufarbeitung der Rattenherzen	23
4.1.7	Material und Geräte zur Ermittlung der Mikrosphärenanzahl	23
4.1.8	Enzymatische Test-Kits	24
4.2	<b>Methodik</b>	<b>24</b>
4.2.1	Die Perfusion isolierter Rattenherzen	24
4.2.2	Einsatz gefärbter Mikrosphären am isolierten Rattenherz	28
4.2.3	Standardversuchsprotokoll	36
4.2.4	ECH- Test	38
4.2.5	Limulus Test	38
4.2.6	Auswertung und Statistik	39

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
5.1	Überblick	40
5.2	Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von ECH	41
5.2.1	Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion	41
5.2.2	Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion	42
5.3	Veränderungen der regionalen myokardialen Perfusion durch ECH	44
5.3.1	Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion	44
5.3.2	Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion	47
5.4	Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von $\alpha$ -Toxin	47
5.4.1	Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion	47
5.4.2	Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion	49
5.5	Veränderungen der regionalen myokardialen Perfusion durch $\alpha$ -Toxin	49
5.5.1	Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion	49
5.5.2	Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion	51
5.6	Vergleichende Betrachtung der Auswirkungen beider Toxine auf die regionale myokardiale Perfusion in der linken Ventrikelwand	51
5.7	Ergebnisse der Kontrollversuche	53
5.8	Ödembildung	54
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
6.1	Herleitung der Fragestellung	56
6.1.1	Pathogenese des septischen Schocks und der septischen Kardiomyopathie	56
6.1.2	Bedeutung bakterieller porenbildender Exotoxine in der Sepsis	57
6.2	Die Anwendung gefärbter Mikrosphären am isoliert perfundierten Rattenherz	57
6.3	ECH und $\alpha$ -Toxin verursachen ausgeprägte Störungen der Herzfunktion und der myokardialen Mikrozirkulation	59
6.4	Die Freisetzung verschiedener vasoaktiver Arachidonsäuremetabolite durch $\alpha$ -Toxin und ECH spiegelt sich in unterschiedlichen regionalen Perfusionsstörungen wieder	60
6.5	Myokardiale Mikrozirkulationsstörungen – ein wesentlicher Beitrag zur Abnahme der Herzkontraktilität unter Einwirkung porenbildender Exotoxine	63
6.6	Die Klinische Relevanz der Ergebnisse	64
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>

<b>8 SUMMARY</b>	<b>67</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>69</b>
<b>10 DANKSAGUNG</b>	<b>87</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure (arachidonic acid)
AU	Absorptionseinheit (absorption unit)
$\alpha$ -Toxin	Alpha-Toxin von <i>Staphylococcus aureus</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic Guanosinemonophosphate)
CPF	coronarer Perfusatfluß (coronary perfusion flow)
CPP	coronarer Perfusionsdruck (coronary perfusion pressure)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dP/dt <sub>max</sub>	maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
ECH	<i>Escherichia coli</i> Hämolyisin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
ENDO	endokardialer Myokardanteil der freien linken Ventrikelwand
EPI	epikardialer Myokardanteil der freien linken Ventrikelwand
ET	Endothelin
5-HPETE	5-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure
HR	Herzfrequenz (heart rate)
HU	hämolytische Einheiten (hemolytic units)
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase
LAL	Limulus Amöbozyt Lysat
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotrien
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichonic acid)
LVDP	linksventrikulär entwickelter Druck (left ventricular developed pressure)

MDS	myokarddepressive Substanz (myocardial depressant substance)
MS	Mikrosphären
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen aktivierender Faktor (platelet activating factor)
PC	Personal Computer
PG	Prostaglandin
PP-Röhrchen	Polypropylen-Röhrchen
REST	Anteile oberhalb der Ventilebene und Herzspitze als Probe zusammengefaßt
RMF	regionaler myokardialer Perfusionsfluß (regional myocardial flow)
RV	rechter Ventrikel
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
SEPT	Aus dem Septum gewonnene Probe
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha

## 2 Vorwort

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit fanden im Zeitraum Juni 1999 bis August 2000 im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger, Medizinisches Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II (Leiter Prof. Dr. W. Seeger), Justus - Liebig - Universität Gießen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. U. Sibelius statt. Sie wurden überwiegend durch Herrn Dr. med. U. Grandel betreut. Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie, einer Komplikation der Sepsis mit maßgeblichem Beitrag zum septischen Schockgeschehen. Untersucht wurde der Einfluß zweier bakterieller Exotoxine klinisch relevanter Sepsiserreger, des *Escherichia coli* Hämolysins und des  $\alpha$ -Toxins von *Staphylococcus aureus*, auf die myokardiale Mikrozirkulation isoliert perfundierter Rattenherzen. Über die Auswirkung bakterieller Exotoxine auf die regionale Myokardperfusion ist bisher nur wenig bekannt. Mit Hilfe gefärbter Mikrosphären wurde deshalb in dieser Arbeit die regionale Perfusion verschiedener Myokardareale bestimmt.

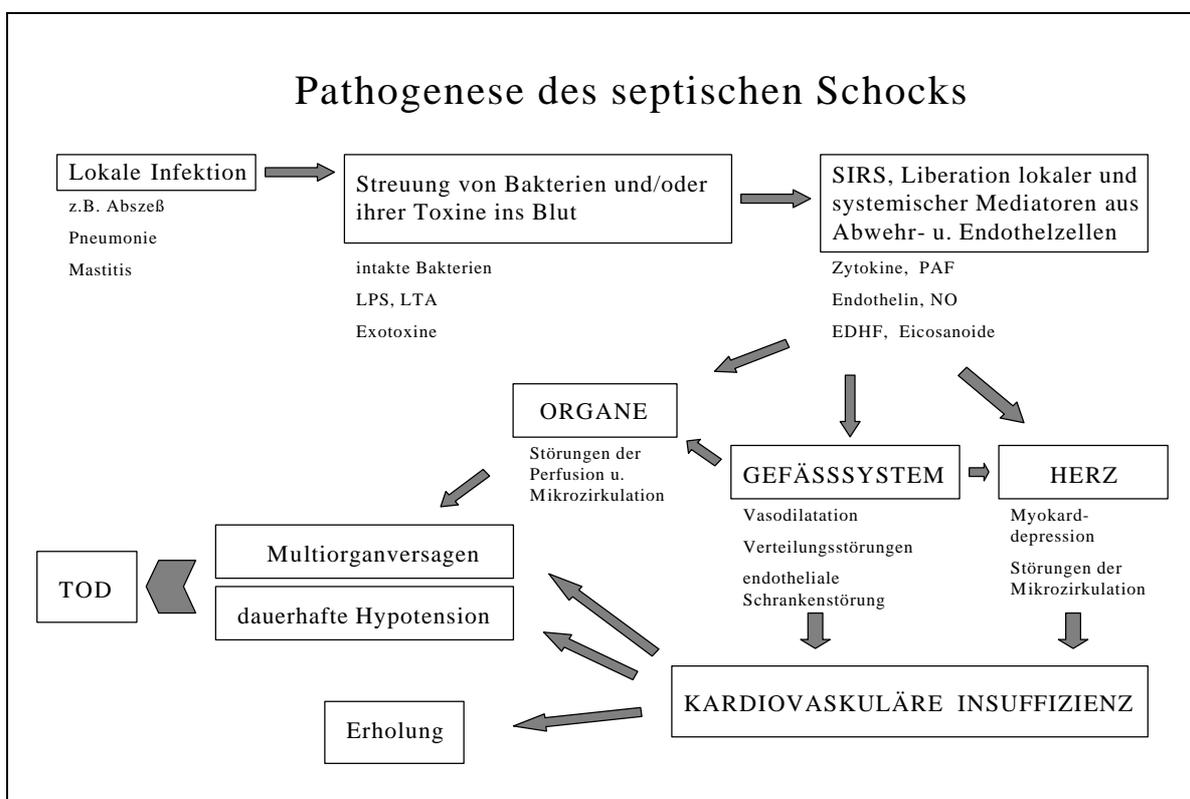
## 3 Einleitung

### 3.1 Klinik und Pathophysiologie der Sepsis

Die Sepsis ist nach wie vor ein Krankheitsbild, welches trotz ständig neuer Antibiotikagenerationen mit einer hohen Letalität einhergeht. In den USA liegt die Inzidenz etwa bei einer halben Million Neuerkrankungen pro Jahr, wobei 30% bis 50% dieser Fälle tödlich verlaufen. Die Sepsis und der septische Schock gehören zu den häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen. Die Errungenschaften der modernen Medizin haben diese ungünstige Prognose nicht wesentlich verbessern können. Ganz im Gegenteil hat besonders auf Intensivstationen das Risiko zugenommen, an einer Sepsis zu erkranken. Verantwortlich dafür ist die Zunahme von Therapiemöglichkeiten für immungeschwächte, schwerkranke und immer älter werdende Patienten. Der Einsatz von Immunsuppressiva und die Verwendung invasiver diagnostischer und therapeutischer Verfahren leistet potentiellen Infektionserregern Vorschub. Zusätzlich führt der häufige Einsatz hochwirksamer Antibiotika zu einer Zunahme bakterieller Resistenzen, so daß sich multiresistente nosokomiale Infektionserreger etablieren. So ist auch in Zukunft von einer Zunahme der Bedeutung septischer Krankheitsbilder auszugehen, zumal trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet keine neuen therapeutischen Konzepte erfolgreich waren (1).

Die Sepsis ist definiert als klinischer Nachweis einer bakteriellen Infektion mit Tachypnoe, Tachykardie und Hyper- oder Hypothermie (2). Eine lokale Infektion bildet den Ausgangspunkt für eine hämatogene Streuung der Erreger oder deren Pathogenitätsfaktoren z.B. in Form von Endo- und Exotoxinen, welche zur systemischen Entzündungsreaktion des Organismus führen. Derartige systemische Reaktionen werden als systemic inflammatory response syndrome (SIRS) bezeichnet und können neben der Sepsis auch andere Ursachen wie Verbrennungen, schwere Traumata oder Nekrosen haben. An ihrer Entstehung sind zelluläre wie humorale Effektoren beteiligt. Komplement- und Gerinnungssystem, Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten sowie zirkulierende und gewebsständige mononukleäre Zellen werden aktiviert und reagieren mit Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen. Diese wiederum beeinträchtigen die Makro- und Mikrozirkulation im gesamten Organismus bis hin zu erheblichen Perfusionsstörungen einzelner oder mehrerer Organe. In diesem fortgeschrittenen Stadium spricht man von Sepsis-Syndrom. Daraus resultierende lokale Gewebsschädigungen können bis zum Organversagen, bei mehr als einem betroffenen Organ zum Multiorganversagen führen. Durch eine ausgeprägte periphere Vasodilatation kommt es

gleichzeitig zur kardiovaskulären Insuffizienz bis zum septischen Schock (s. Abb.1). Von septischem Schock spricht man in der Humanmedizin bei einem systolischen Blutdruckabfall auf unter 90 mmHg oder um 40 mmHg vom Ausgangswert trotz adäquater Flüssigkeitsgabe (2). Anders als beim hypovolämischen und kardiogenen Schock beobachtet man im septischen Schock eine initiale hyperzirkulatorische Phase, die durch eine ausgeprägte Vasodilatation bei gesteigertem Herzminutenvolumen und warmer Hautoberfläche gekennzeichnet ist. Die Steigerung des Herzminutenvolumens vermag jedoch nicht den erniedrigten Blutdruck dauerhaft zu kompensieren. Der Zustand der Hyperzirkulation ändert sich meist erst in der Präfinalphase des Schocks, sofern keine Stabilisierung des Patienten möglich ist. Erst dann kann es auch zur Erhöhung des peripheren Widerstandes bei erniedrigtem Herzminutenvolumen kommen (3, 4). Aufgrund der Fähigkeit zur Erhöhung des Minutenvolumens ist dem Herzen lange Zeit wenig Bedeutung im septischen Geschehen beigemessen worden, obwohl es die zur Kompensation des Blutdruckabfalls erforderliche Leistungssteigerung um das zwei- bis dreifache der Norm nur selten erreicht. Neuere klinische und tierexperimentelle Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß das Herz ebenso wie Lunge, Niere, Leber und Darm zur Gruppe der von der Sepsis speziell betroffenen Organe zählt (5).



**Abb.1:** Schema der Pathogenese des septischen Schocks mit Verflechtung unterschiedlicher Organsysteme.

### 3.2 Das Krankheitsbild „Septische Kardiomyopathie“

Die eingeschränkte Fähigkeit zur Steigerung der Herzleistung in der Sepsis ist Folge einer direkten Myokardschädigung, für die sich der Begriff der *septischen Kardiomyopathie* eingebürgert hat. Sie tritt schon in der Frühphase der Sepsis auf und wird mittlerweile in vielen Fällen für das septische Schockgeschehen mitverantwortlich gemacht. Insbesondere letale septische Schocks sind, wie klinische Studien belegen, durch verminderte Herzkontraktilität gekennzeichnet (6). Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen beschreiben ein einheitliches Krankheitsbild, welches durch eine trotz des gesteigerten Herzminutenvolumens vorhandene Herzinsuffizienz gekennzeichnet ist (6-13).

Charakteristisch für den septischen Schock ist das Absinken des peripheren Widerstandes auf etwa 30% des Ausgangswertes. In der Frühphase der Sepsis kann durch Steigerung des Herzminutenvolumens der drohende Blutdruckabfall verhindert werden, jedoch läßt sich schon in dieser Phase eine beträchtliche Störung der Herzfunktion nachweisen. Sie ist durch eine Verminderung der links- und rechtsventrikulären Auswurffraktion bei gleichzeitiger Dilatation beider Ventrikel gekennzeichnet. Enddiastolisches und endsystolisches Volumen sind erhöht. Die Verminderung der rechtsventrikulären Auswurffractionen ist unabhängig von einer Steigerung der pulmonalarteriellen Nachlast. Dies ergaben Radionuklidventrikulographien und Echokardiographien an septischen Patienten (7-11). In einigen Studien geht dieses Geschehen mit segmentalen oder globalen Hypokinesien des Ventrikelmyokards einher. Diese wurden auch in Abwesenheit kardialer Grunderkrankungen beobachtet und bildeten sich nach überstandener Schockphase zurück (12). Zudem ist bei septischen Patienten häufig eine gestörte Volumen-Druck-Beziehung im Sinne einer erhöhten ventrikulären Compliance nachweisbar. Die Compliance (k) ist ein Maß für die Dehnbarkeit eines Systems und errechnet sich aus der Volumenänderung ( $\Delta V$ ) geteilt durch die Druckänderung ( $\Delta p$ ) der Ventrikel ( $k = \Delta V / \Delta p$ ). Die gestörte Volumen-Druck-Beziehung zeichnet sich dadurch aus, daß die im septischen Schock obligatorische Infusionstherapie zwar zu einer Erhöhung des pulmonalkapillären Druckes und des linken Ventrikelvolumens, jedoch zu keiner adäquaten Erhöhung der Herzleistung führt (13). Untersuchungen zur coronaren Zirkulation septischer Schockpatienten ergaben eine verringerte Sauerstoffextraktion bei erhöhtem coronaren Blutfluß und erniedrigtem coronaren Gefäßwiderstand. Obwohl dieser Befund eine globale Minderperfusion des Herzens in der Sepsis weitgehend ausschließt, ist er dennoch vereinbar

mit dem Auftreten von Mikrozirkulationsstörungen, die in der Sepsis in vielen anderen Organen beobachtet wurden. Inwieweit mikrozirkulatorische Störungen, z.B. im Sinne eines kapillären Shuntings, für die Entstehung der septischen Kardiomyopathie verantwortlich sein könnten, ist bisher nicht am Menschen untersucht worden (14, 15). Charakteristisch für das Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie ist die potentielle Reversibilität. Wird die Schockphase unter Infusionstherapie und Katecholamingabe überlebt, bildet sich nach 7 bis 10 Tagen die Myokarddepression vollständig zurück (1, 8).

Die beschriebenen pathophysiologischen Abläufe konnten in verschiedenen Arbeitsgruppen an Tiermodellen reproduziert werden. Natanson et al. demonstrierten an mit *Escherichia coli* (*E. coli*) infizierten Hunden eine Dilatation beider Ventrikel mit erhöhten endsystolischen und enddiastolischen Volumina in der hyperzirkulatorischen Phase. Eine Zunahme der Compliance als Ausdruck einer gestörten Volumen-Druck-Beziehung stellte sich ebenfalls ein (16, 17). Die Herzkontraktilität zeigte auch bei Stahl et al. dem klinischen Bild septischer Patienten entsprechende Alterationen. An Hunden mit Peritonitis konnte hier bei hyperzirkulatorischer Kreislaufsituation eine ventrikuläre Dilatation beobachtet werden (18). Auch Herzen septischer Ratten zeigten schon zu Beginn der hyperzirkulatorischen Phase deutliche Abnahmen der Kontraktilität (19, 20). Bei Schweinen hatte eine chronische Endotoxämie einen negativ inotropen Effekt auf den linken Ventrikel (21), wobei eine erhöhte coronare Perfusion beobachtet wurde (22). Die Arbeiten von Bloos et al. ergaben bei Schafen eine erhöhte Coronarperfusion mit verminderter Sauerstoffextraktion, wie sie auch in anderen Organen in der Sepsis beobachtet werden konnte (23). Obwohl dieser Befund eine globale Ischämie des Myokards ausschließt, könnte er durch mikrozirkulatorische Störungen erklärt werden. Adams et al. konnten durch ihre Experimenten bestätigen, daß die verminderte Herzkontraktilität in der Sepsis nicht Konsequenz einer globalen myokardialen Ischämie ist (24). Das Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie ist somit im einzelnen an verschiedenen Tierarten nachvollzogen worden. Humanklinische wie tierexperimentelle Befunde beschreiben ein klar definiertes Krankheitsbild, dessen speziesübergreifende Bedeutung zumindest im Reich der Mammalia offenbar ist.

### **3.3 Mögliche Ursachen der septischen Kardiomyopathie**

Trotz umfangreicher Forschungsarbeit ist die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie immer noch unzureichend geklärt. Verschiedene Ansätze erbrachten zwar vielversprechende Ergebnisse, doch scheint es sich um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln, da verschie-

dene Ansätze die Ursache oft teilweise, jedoch nie umfassend erklären konnten. Lange Zeit stand die Suche nach einer kardiodepressiven Substanz im Vordergrund (myocardial depressant substance, MDS). Parrillo et al. konnten Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukine (IL) als in dieser Weise wirkende Substanzen identifizieren. Diesen proinflammatorischen Zytokinen scheint eine tragende Rolle bei den kardiovaskulären Veränderungen der Sepsis zuzukommen (25). Gleichzeitig rückt aber die Theorie, daß Mikrozirkulationsstörungen ebenfalls eine Rolle spielen, in den Blickwinkel aktueller Untersuchungen.

### **3.3.1 Zytokine als Myocardial Depressant Substances**

Parrillo et al. entdeckten 1985 die Anwesenheit einer myokarddepressiven Substanz im Serum sepsiskrankter Schockpatienten. Isolierte Kardiomyozyten zeigten unter Einfluß dieser Sera eine reduzierte Kontraktilität (26). Es zeigte sich, daß die beiden Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die gleiche negativ inotrope Wirkung auf die Kontraktion isolierter Kardiomyozyten hatten wie das septische Schockserum. Nach Entfernung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch Immunabsorption aus dem Serum sepsiskrankter Schockpatienten konnte der durch das Serum induzierte negativ inotrope Effekt aufgehoben werden (27). Auch andere Arbeiten zeigten in vitro einen negativ inotropen Effekt von TNF- $\alpha$  oder IL auf isolierte Kardiomyozyten oder isolierte Herzen (28-31). Bei mit Endotoxin vorbehandelten Ratten konnte ein Anstieg von TNF- $\alpha$  mit gleichzeitiger Myokarddepression gezeigt werden (29). Untersuchungen von Patienten im septischen Schock wiesen erhöhte Serumspiegel von TNF- $\alpha$  und Interleukinen auf (32, 33, 35). TNF- $\alpha$ -Gaben führten bei Ratten nach intravenöser Gabe zu einer hyperdynamischen Kreislaufsituation und einer Beeinträchtigung der Herzfunktion (34, 38). Zur Erklärung des Wirkungsmechanismus der Zytokine gibt es mittlerweile mehrere Ansätze. Zum einen deuten Experimente auf eine sphingosinvermittelte Störung der intrazellulären Kalziumhomöostase hin (28, 41, 42), aber auch Stickstoffmonoxid (NO) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) scheinen Effektoren der zytokininduzierten myokardialen Dysfunktion zu sein (40, 41). Diese Befunde weisen insgesamt auf die große Bedeutung der Zytokine im septischen Geschehen hin. Da aber Anti-Zytokin-Strategien weder klinisch noch tierexperimentell das Auftreten der septischen Kardiomyopathie verhindern konnten, müssen andere Pathomechanismen zu ihrer Entstehung beitragen (37-39).

### 3.3.2 Mikrozirkulationsstörungen

Verglichen mit der Flut von Untersuchungen zur Wirkungsweise der Zytokine am Herz sind bisher Untersuchungen zur Perfusion des Coronarsystems unter septischen Bedingungen, insbesondere auf mikrozirkulatorischer Ebene, vernachlässigt worden. Neuere Forschungsergebnisse weisen zunehmend auf die Bedeutung pathophysiologischer Veränderungen der coronaren Vasoregulation hin. Wie bereits erwähnt, zeichnet sich die septische Kardiomyopathie durch einen erhöhten coronaren Blutfluß bei verminderter Sauerstoffextraktion aus (14, 23). Offensichtlich besteht ein ausreichendes Sauerstoffangebot und die myokardialen Alterationen entstehen somit nicht auf der Grundlage einer global-hypoxischen Schädigung des Herzens. Bei adäquater Volumensubstitution septischer Individuen beruht die gestörte Pumpfunktion des Herzens nicht auf einer globalen Hypoperfusion. Trotzdem ist eine ursächliche Beteiligung der coronaren Perfusion am Geschehen oft diskutiert worden, da Störungen der coronaren Zirkulation aufgrund der geringen hypoxischen Toleranz des Herzens sofort in einer Minderung der Herzleistung resultieren würden (54). Tierexperimentelle Untersuchungen belegen, daß sowohl die coronare Autoregulation als auch die kardiale Mikrozirkulation in der Sepsis erheblich beeinträchtigt sind. Studien zum Sauerstoffmetabolismus septischer Schafe ergaben, daß das Herz im Sinne einer gestörten coronaren Autoregulation und O<sub>2</sub>-Extraktion nur unzureichend auf hypoxische Zustände reagieren kann. Im Zustand der künstlich erzeugten Hypoxie konnten nichtseptische Kontrolltiere im Vergleich zu septischen Tieren ihren coronaren Blutfluß um das Dreifache steigern, während sich gleichzeitig ihre myokardiale Sauerstoffextraktion erhöhte. Die metabolische Sauerstoffreserve septischer Schafe war hingegen wesentlich eher ausgeschöpft (23). Unter metabolischer Sauerstoffreserve versteht man die Fähigkeit des Herzens, durch Erhöhung des coronaren Blutflusses und Rekrutierung von Reservekapillaren das Gewebe intensiver zu perfundieren, um so die Sauerstoffaufnahme erhöhen zu können. Voraussetzung dafür sind eine intakte Reaktivität der Arteriolen sowie eine intakte Mikrozirkulation (15). Diese Befunde deuten somit auf Störungen der Mikrozirkulation hin, die möglicherweise zu fokalen ischämischen Myokardschäden führen könnten. Histologische Untersuchungen septischer Organe von Hersch et al. zeigen histopathologische Befunde im Myokard, die diese Hypothese unterstützen. Im einzelnen wurden inter- und intrazelluläre Ödeme, degenerative Schäden der Mitochondrien, sowie Nekrosen einzelner Muskelfasern gefunden. Fibrinthromben in den Kapillaren und größere zusammenhängende infarzierte Areale gab es jedoch nicht. Diese Beobachtungen erfolgten in Abwesen-

heit einer globalen Hypoperfusion und sind lediglich mit Störungen der regionalen Perfusion vereinbar (43). Gründe für Alterationen auf mikrozirkulatorischer Ebene können neben Gefäßobstruktionen durch Mikrothromben oder aufgrund erhöhter Endothelpermeabilität einsetzender Ödembildung auch durch vasoaktive Substanzen verursachte Störungen der Gefäßmotorik sein. Diesbezüglich ist bei anderen Organen wie Darm, Lunge und Skelettmuskulatur unter septischen Bedingungen unlängst ein Nebeneinander über- und unterperfundierter Kapillarabschnitte im Sinne einer funktionellen Shunt-Bildung nachgewiesen worden, welches mit mangelnder Versorgung und Funktionsstörung des betroffenen Gewebes einherging (44-52). Es liegt der Verdacht nahe, daß im Herzen ähnliche Mechanismen zum Tragen kommen. Groeneveld et al. gelang es, mittels radioaktiv markierter Mikrosphären mit nachlassender Herzleistung korrelierende Perfusionsinhomogenitäten in Herzen endotoxinämischer Hunde nachzuweisen. Im üblicherweise heterogenen coronaren Blutfluß des Herzens ließen sich im Endotoxinschock bei unverändertem globalen Blutfluß vorwiegend im linken Ventrikelmyokard lokalisierte Umverteilungen feststellen. Im wesentlichen kam es zu einer Verminderung des regionalen Blutflusses in den endokardial gelegenen Gewebsabschnitten. Da physiologischerweise der endokardiale Sauerstoffbedarf höher ist, als der des Epikards, stellt diese Umverteilung des Blutflusses höchstwahrscheinlich eine die Herzfunktion beeinträchtigende Störung dar (53). In isolierten Herzperfusionen konnten nach Endotoxinexposition lokale myokardiale Ischämien beobachtet werden, obwohl coronarer Fluß und myokardiale O<sub>2</sub>-Extraktion erhöht waren (54). Diese Befunde deuten auf eine intensive Beteiligung vasoaktiver Mediatoren hin, die im Rahmen der Sepsis als systemische oder lokale Reaktion des Körpers auf bakterielle Pathogenitätsfaktoren in großen Mengen ausgeschüttet werden. Sie könnten mit einer Mischung aus vasokonstriktiven und -dilatativen Wirkungen für Verteilungsstörungen der myokardialen Perfusion sorgen, welche wiederum in einer gestörten Herzkontraktilität gipfeln könnten. Im folgenden sollen einige der wichtigsten vasoaktiven Mediatoren der Sepsis besprochen werden.

### **3.4 Vasoaktive Mediatoren in der Sepsis**

Der Bildung und Freisetzung vasoaktiver Mediatoren kommt bei der Entstehung der Sepsis eine herausragende Bedeutung zu. Diese ist in einer Vielzahl von Arbeiten belegt worden und bildet auch weiterhin einen Schwerpunkt der Sepsisforschung. Plättchen aktivierender Faktor (PAF), Endothelin (ET), endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) und NO zeichnen sich durch konstriktive oder dilatative Wirkungen an Gefäßen aus, welche im Rahmen der

Sepsis zu Alterationen der Mikrozirkulation führen. Die Derivate der Arachidonsäure (AA) sind ebenso bedeutsame vasoaktive Substanzen, die besonders im Zusammenhang mit bakteriellen Exotoxinen wie *Escherichia coli* Hämolysin (ECH) und *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin ( $\alpha$ -Toxin) untersucht worden sind. In der Sepsis kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels, die zu einer Freisetzung reaktiver, vasomotorisch hochpotenter Metaboliten, der Eicosanoide, führt.

### **3.4.1 Plättchen Aktivierender Faktor, Endothelin, Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor und Stickstoffmonoxid**

PAF steht für Plättchen-aktivierenden Faktor. Hierbei handelt es sich um ein von Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten aber auch von Endothelzellen produziertes und freigesetztes Phospholipid, welches im Plasma schnell inaktiviert wird. Dieser potente Entzündungsmediator vermag neben der Aggregation von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten auch Effekte auf die Vasomotorik und Gefäßpermeabilität zu vermitteln. Neben einer pulmonalen Hypertonie in isolierten Lungen erzeugte PAF in isolierten Herzpräparationen dosisabhängig vasokonstriktive wie -dilatative Wirkungen sowie eine Abnahme der Herzkontraktilität (55-58). Die vasokonstriktischen Wirkungen in Herz und Lunge scheinen dabei Leukotrien C<sub>4</sub>-vermittelt zu sein (55, 56), wurden aber auch schon mit einer PAF-induzierten Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin (ET) in Zusammenhang gebracht (58). Dieses vorwiegend von Endothelzellen synthetisierte Peptid vermittelt über die Rezeptoren ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> seine Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur. Angiotensin II und Thrombin dienen ebenso wie Hypoxie bzw. Ischämie als Stimulus für die Synthese des biologisch aktiven ET-1 über intrazelluläre Zwischenstufen (59-61). Der Plasmaspiegel von ET-1 kann auch in der Sepsis erhöht sein und scheint eine bedeutende Rolle im Krankheitsgeschehen zu spielen (62-64). An isolierten Herzen konnte durch Endothelin eine Vasokonstriktion der Coronararterien erzeugt werden (61, 65), und es wurde auf mikrozirkulatorischer Ebene im Bereich kleiner Arteriolen eine inhomogene Vasokonstriktion verschiedener Areale beobachtet. Die Regulation der kapillären Perfusion scheint somit unter anderem auch Endothelin zu unterliegen (66). Eine beschriebene myokardiale Depression unter Endothelin schien jedoch nach aktuellem Wissen allein durch die vasokonstriktive Flußminderung verursacht worden zu sein (65), da Endotheline keine direkt negativ inotropen Eigenschaften besitzen (67). Im Gesamtorganismus scheint die vasokonstriktive Wirkung auf eine NO-ET-1-Imbalance zu beruhen (63, 64), wobei im ischämisch geschädigten Herz ein Zusammenspiel mit Thromboxan A<sub>2</sub> vorgeschlagen wurde

(61). PAF und ET-1 stellen von Endothel synthetisierte Vasokonstriktoren dar. Doch auch dilatativ wirkende Mediatoren wie NO und der erst kürzlich entdeckte endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) werden vom Endothel abgegeben. Arbeiten von Nishikawa et al. zur Acetylcholin-induzierten Dilatation in der coronaren Mikrozirkulation demonstrierten, daß die Dilatation großer Arteriolen vorwiegend durch NO, kleinerer durch NO und EDHF vermittelt wurde. EDHF scheint ein Produkt von Cytochrom P-450 Enzymen zu sein und spannungsabhängig über die Öffnung von Kaliumkanälen zu wirken (68, 71, 73). In Abwesenheit von NO dilatierten Arteriolen in der Skelettmuskulatur allein über EDHF (72, 73). Es gibt Anzeichen, daß in der Sepsis die Wirkung oder die Bildung von EDHF abgeschwächt und somit die Vasoregulation beeinträchtigt ist (69, 70). Von großer Bedeutung für die kardiovaskulären Veränderungen in der Sepsis bleibt jedoch der potente Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO). Daß NO den Gefäßtonus im gesamten Körper mitbestimmt, ist seit längerem bekannt und scheint auch für das Herz zu gelten (75). Aus der Aminosäure L-Arginin wird durch konstitutive NO-Synthasen (cNOS) im vaskulären Endothel das hochreaktive NO synthetisiert und ein basaler NO-Spiegel im Blut aufrechterhalten (74). Klinische und experimentelle Untersuchungen zeigten, daß durch Zytokine und Lipopolysaccharide (LPS) eine zusätzlich induzierbare NO-Synthase (iNOS) aktiviert wird, die für eine Überproduktion von NO bei inflammatorischen Krankheitsbildern sorgt. Als Orte der iNOS-Aktivität wurden neben Endothelzellen auch Kardiomyozyten identifiziert (76-78). Es wird davon ausgegangen, daß dieser NO-Überschuß maßgeblich an der gestörten Vasoregulation im septischen Schock beteiligt ist. Studien ergaben bei septischen Patienten und im Tierexperiment erhöhte Plasmaspiegel von Nitrit und Nitrat, stabilen und unwirksamen Oxidationsprodukten von NO. Diese korrelierten mit hyperdynamischen Kreislaufeffekten (79, 80). Neben einer Steuerung des coronaren Gefäßtonus belegen verschiedene Arbeiten auch eine direkt negativ inotrope Wirkung von NO auf die Herzkontraktion, was diesem Mediator eine besondere Bedeutung bei der Entstehung der septischen Kardiomyopathie zuteil werden läßt (76, 78, 81, 82). Darüberhinaus gibt es Hinweise, daß die negativ inotropen Effekte von LPS und Zytokinen NO-vermittelt sind (83, 84). Es liegt die Vermutung nahe, NO könne die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie weitreichend erklären. Doch neuere Erkenntnisse zeigen, daß weitere Pathomechanismen vorliegen müssen. Die Kontraktilitätsstörung isolierter Herzen septischer Ratten konnte durch iNOS-Inhibitoren lediglich attenuiert werden (81). Zudem trat der Zustand der Hyperzirkulation bei septischen Ratten wesentlich früher auf als ein Anstieg von NO im Blut (79). Die Behandlung von Patienten im septischen Schock mit NO-Synthase-

Inhibitoren konnte zwar die kardiovaskulären Veränderungen abschwächen, nicht aber die Überlebensrate verbessern (85).

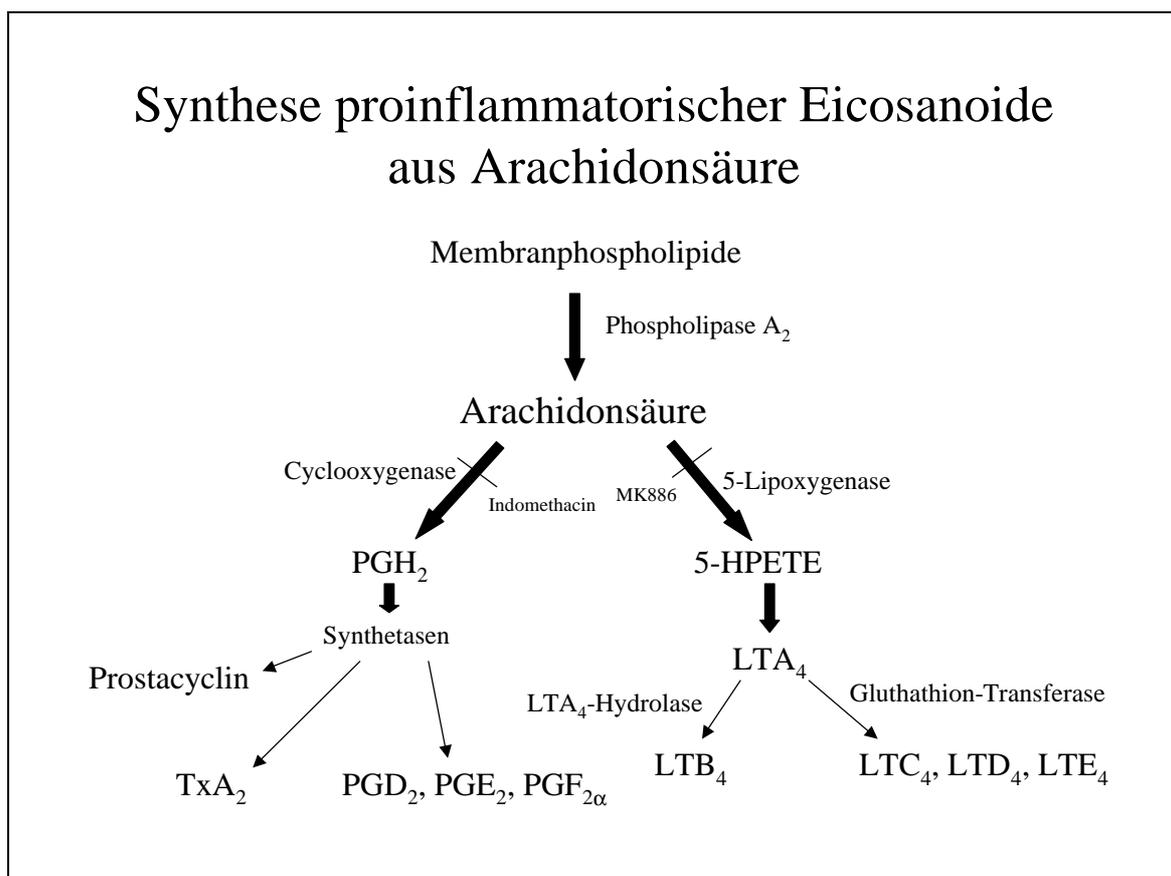
### 3.4.2 Arachidonsäuremetabolite

Arachidonsäure (AA), eine vierfach ungesättigte C20-Fettsäure, bildet die Ausgangssubstanz zur Synthese einer Reihe von proinflammatorischen Lipidmediatoren aus der Gruppe der Eicosanoide. Sie liegt in Membranlipiden verestert vor und wird durch verschiedene Phospholipase A<sub>2</sub>- Typen aus der Membran mobilisiert. Die freie AA kann mittels zweier Oxygenase-Systeme, über die Cyclo- und die Lipoxygenase, zu aktiven Entzündungsmediatoren verstoffwechselt werden (Abb.2). Die Cyclooxygenase katalysiert die Bildung von Prostaglandin (PG)H<sub>2</sub> über PGG<sub>2</sub>. PGH<sub>2</sub> wird über Synthetasen zu Prostacyclin, Thromboxan (Tx)A<sub>2</sub> und den Prostaglandinen D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> und F<sub>2α</sub> umgesetzt. Während die Prostaglandine teilweise antagonistische Wirkungen auf die glatte Muskulatur von Bronchien und Gefäßen haben, ist TxA<sub>2</sub> neben seinem thrombozytenaggregationsfördernden Effekt vor allem ein hochwirksamer Vasokonstriktor, besonders im pulmonalen und coronaren Gefäßsystem (50, 90, 93, 95). Die Synthese von TxA<sub>2</sub> konnte im Herzen nachgewiesen werden, wobei Endothelzellen des Coronarsystems und glatte Gefäßmuskelzellen als Syntheseorte beschrieben worden sind (90, 95, 96). Prostacyclin hat dagegen vasodilatatorische Effekte, wirkt der Thrombozytenaggregation entgegen und verursacht darüber hinaus eine Erniedrigung der Gefäßpermeabilität (91, 92). Wie Bernard et al. nachweisen konnten, sind die Spiegel von TxA<sub>2</sub> und Prostacyclin in der Sepsis erhöht (86). Neben der Cyclooxygenase können verschiedene Lipoxygenasen die Oxidation der AA zu weiteren Eicosanoiden vermitteln. Die 5-Lipoxygenase produziert ein instabiles Hydroxyperoxyd (5-HPETE), aus welchem eine weitere Zwischenstufe, das Leukotrien (LT)A<sub>4</sub>, entsteht. LTA<sub>4</sub> wiederum wird zu LTB<sub>4</sub> hydrolysiert, oder es entstehen über eine Glutathion-S-Transferase die Cysteinylleukotriene LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub>. LTB<sub>4</sub> agiert als Aktivator leukozytärer Migration und anderen Zellfunktionen. Die Cysteinylleukotriene sind Vaso- und Bronchiokonstriktoren und führen durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität und durch eine postkapillär betonte Vasokonstriktion zu Plasmaexsudation und Ödembildung (87, 94). Ihre Bildung und ihre Wirkung finden nachweislich unter anderem im Herzen statt, wobei bisher endothelassoziierte Leukozyten, Monozyten und Mastzellen als Syntheseorte identifiziert wurden (89, 140, 141). LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> scheinen unter den Leukotrienen den größten vasokonstriktorischen Effekt auf die coronare Zirkulation zu haben (88). Eicosanoide sind in der Schädigung von Organen in der Sepsis maßgeblich beteiligt.

Speziell bakterielle porenbildende Exotoxine vermögen den AA-Metabolismus zu aktivieren (s. 3.5.2.).

### 3.5 Bedeutung bakterieller Pathogenitätsfaktoren bei der Pathogenese der Sepsis und der septischen Kardiomyopathie

Nicht nur intakte Bakterien, sondern auch ihre isolierten Pathogenitätsfaktoren sind in der Lage durch Aktivierung verschiedener proinflammatorischer Zellreaktionen septische Krankheitsbilder auszulösen. Große Bedeutung scheint hierbei dem Endotoxin gramnegativer Bakterien zuzukommen, das lange Zeit im Mittelpunkt der Sepsisforschung stand. Es zeigte sich aber, daß die Intensität kardiovaskulärer Veränderungen der Sepsis nicht mit der Stärke der assoziierten Endotoxämie korrelierten (100) und auch durch grampositive, LPS-freie Bakterien in vollem Umfang verursacht werden konnten (97). Strukturelle Bestandteile der grampositiven Bakterien, wie Lipoteichonsäuren (LTA) und Peptidoglykane, vermochten im Experiment gleiche oder ähnliche pathologische Vorgänge wie LPS zu induzieren (98, 99). Neben



**Abb.2:** Schema zur Synthese wichtiger Eicosanoide aus Arachidonsäure. *PG* = Prostaglandin, *HPETE* = Hydroxyperoxyeicosatetraensäure, *LT* = Leukotrien, *Tx* = Thromboxan.

den strukturellen Bestandteilen bakterieller Sepsiserreger rücken heute auch die aktiv sezernierten Exotoxine klinisch relevanter Sepsiserreger wie *E. coli*, *Staphylococcus aureus* oder verschiedene Streptokokken- und Pseudomonadenspezies in den Mittelpunkt des Interesses. Im folgenden sollen als Prototypen der strukturellen bakteriellen Pathogenitätsfaktoren LPS und LTA mit ihren Wirkungen vorgestellt werden. Näher eingegangen wird anschließend auf porenbildende Exotoxine, welche durch die Bildung transmembranöser Poren eine völlig andere Form bakterieller Pathogenität darstellen.

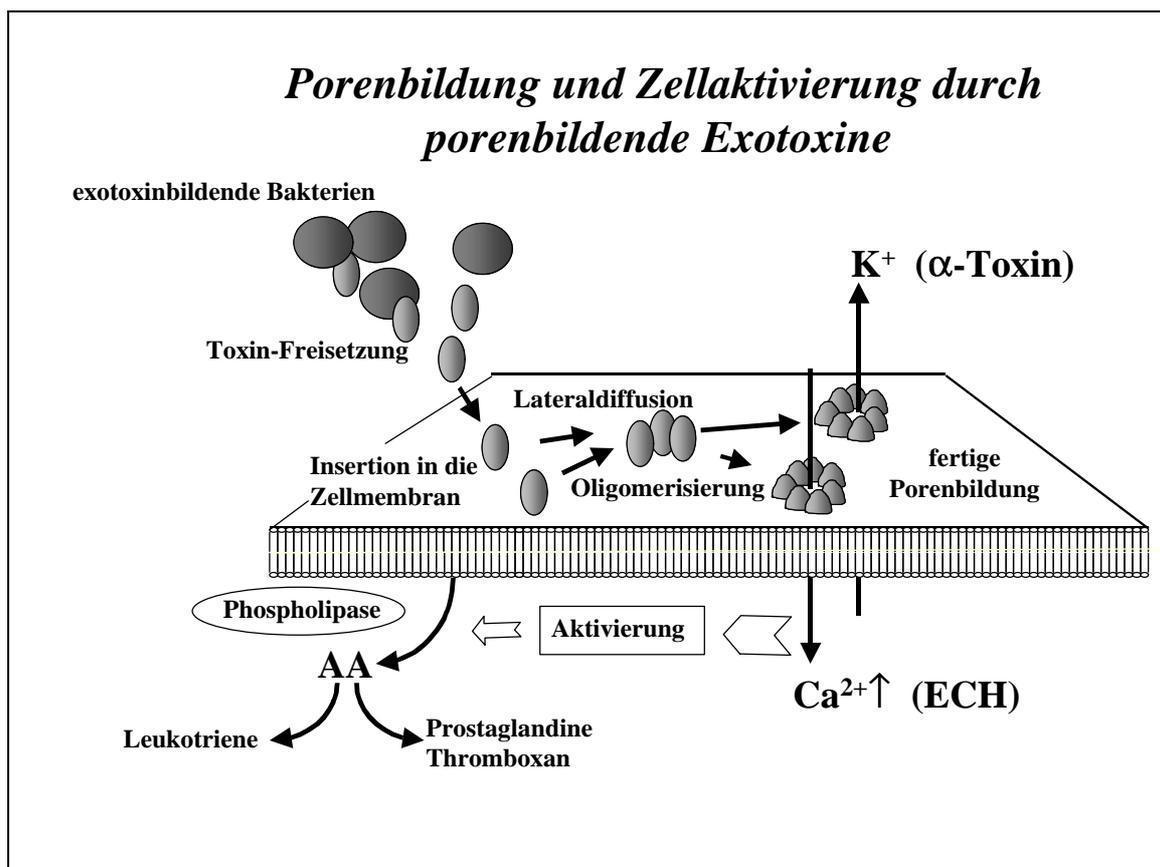
### **3.5.1 Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäuren**

Lipopolysaccharide (LPS), auch als Endotoxin bezeichnet, entwickeln ihre Toxizität nach Freisetzung aus der Bakterienwand. LPS ist Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und besteht aus einer spezifisch antigenen Oligosaccharid-Region, einer Core-Region und schließlich dem für die Toxizität verantwortlichen Lipid A. Bei Patienten mit gramnegativer Sepsis läßt sich Endotoxin im Serum nachweisen (101-103). Gesunde Probanden bildeten nach intravenöser LPS-Applikation die gleichen kardiovaskulären Veränderungen aus, welche bei Patienten im septischen Schock beobachtet wurden (104). Entsprechend nachvollzogen wurden diese auch im Ganztiermodell (105). An isolierten Herzen und an Kardiomyozyten zeigte sich eine verringerte Kontraktilität unter Endotoxin (106-108). Ein Zusammenhang der Endotoxinwirkung mit Zytokinen und iNOS wurde mehrfach nachgewiesen (83, 103, 105).

Die biologische Wirkung des grampositiven Zellwandbestandteils Lipoteichonsäuren (LTA) scheint ebenfalls über die Induktion einer NOS vermittelt zu sein. Dies fanden Arbeitsgruppen heraus, die sich mit der Genese des Schocks bei grampositiver, endotoxinfreier Sepsis beschäftigten (99, 109-111). In Ganztiermodellen konnten durch LTA hyperzirkulatorische Kreislaufstörungen induziert werden. Bei Ratten gingen die Zirkulationsstörungen mit einem Anstieg der Zytokinkonzentrationen im Blut und einer Induktion der iNOS einher (99, 111) und konnten durch iNOS-Inhibition deutlich verringert werden (111). In isolierten Arterien induzierte LTA eine Hyporeaktivität der glatten Muskulatur, die durch NOS-Inhibitoren aufgehoben werden konnte (110). Monozyten reagierten unter Einfluß von LTA mit TNF- $\alpha$  Produktion (112). All diese Befunde unterstreichen die Bedeutung von LTA bei der grampositiven Sepsis. Da bei Schweinen der durch LTA induzierte septische Zustand jedoch nicht mit einem NO- oder Zytokinanstieg im Blut korrelierte (98), scheinen weitere ungeklärte Wirkmechanismen der grampositiven Sepsis vorzuliegen.

### 3.5.2 Porenbildende bakterielle Exotoxine

Die Mehrheit der klinisch relevanten Sepsiserreger synthetisiert und sezerniert sogenannte Exotoxine. Die Synthese und Freisetzung dieser Toxine bestimmt zu einem Großteil die Pathogenität der entsprechenden Erreger. Neben denjenigen Exotoxinen, welche ihre Wirkungen erst nach Aufnahme in das Zytoplasma ihrer Zielzellen entfalten, wie z.B. Cholera-toxin oder Neurotoxine, spielen in der Sepsis zellmembranschädigende Exotoxine eine bedeutsame Rolle. Wichtige Beispiele dazu sind die Zytolysine von *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und verschiedener Streptococcenspezies. Diese Zytolysine besitzen die Fähigkeit zur Porenbildung in der Zellmembran ihrer Zielzellen. Sie bestehen aus hydrophilen Polypeptidmonomeren, die bei Interaktion mit der Lipiddoppelschicht der Wirtszellmembran in einen amphiphilen Zustand übergehen. Dadurch verankern sie sich in der Membran und vermögen durch



**Abb.3:** Schema zur Porenbildung und Zellaktivierung durch bakterielle Exotoxine. Die Zelle wird bei ECH durch einen Kalziueinstrom, bei  $\alpha$ -Toxin durch Störung der Natrium-Kalium-Homöostase aktiviert und reagiert mit der Produktion von Eicosanoiden. AA = Arachidonsäure.

kreisförmige Oligomerisierung transmembranöse Poren zu bilden, die in Abhängigkeit von der Morphologie der entstehenden Pore zur Lyse der Zelle oder zur Aktivierung sekundärer Zellmechanismen durch transmembranöse Ionenströme führen können (s. Abb.3, 113). Die beiden klinisch bedeutsamen Sepsiserreger, *E.coli* und *Staphylococcus aureus*, bilden Hämolyse, die zur Pathogenese der Sepsis beitragen und deren klinische Relevanz in zahlreichen Experimenten belegt wurde. Diese Hämolyse, *E. coli* Hämolyse und *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin, gelten als Prototypen porenbildender Exotoxine und führen an isolierten Organen unter anderem zu einer Stimulation des AA-Stoffwechsels und zur Freisetzung vasoaktiver Eicosanoide, die wiederum an der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen beteiligt sind (s.u.). Sie sollen im folgenden charakterisiert werden.

### 3.5.2.1 Charakterisierung und pathophysiologische Bedeutung von *Staphylococcus aureus* $\alpha$ -Toxin

*Staphylococcus aureus* kann bei Mensch und Tier eine Vielzahl lokaler Entzündungsprozesse verursachen, ist gleichzeitig einer der häufigsten grampositiven Sepsiserreger und erlangt besondere Bedeutung als nosokomialer Keim. Die meisten Stämme produzieren, neben verschiedenen anderen Exotoxinen, das  $\alpha$ -Toxin, ein wasserlösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 34kD, welches als wichtigster Pathogenitätsfaktor dieser Kokken angesehen wird. Das Proteinmonomer bindet in niedrigen Konzentrationen möglicherweise über bisher nicht identifizierten Rezeptoren an der Oberfläche verschiedener Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Kaninchenerythrozyten, Monozyten und humane Thrombozyten. In hohen Konzentrationen vermag es unspezifisch an jede Lipidmembran zu binden (114). In beiden Fällen werden durch Konformationsänderungen im Molekül hydrophobe Sequenzen freigelegt, die die Insertion in die Lipidmembran ermöglichen (115, 122). Anschließend verbinden sich die Monomere per Lateraldiffusion zu Heptameren, die eine transmembranöse hydrophile Pore bilden (Abb.3). Sie ist irreversibel in der Membran verankert, konnte elektronenmikroskopisch dargestellt werden und steht senkrecht zur Membran (114, 120, 121). Bei sublytischen Toxindosen bilden sich Poren, die für monovalente Ionen wie Kalium und Natrium passierbar sind. Es kommt in diesem Fall zu einer Störung der Natrium-Kalium-Homöostase in den befallenen Zellen, die wiederum zu einer Aktivierung unterschiedlicher subzellulärer Mechanismen führen kann: Ein Kaliumausstrom aus der Zelle bewirkte in Monozyten eine Aktivierung von interleukin-converting enzyme und führte in T-Lymphozyten zu Apoptose (113).

Die Störung der Natrium-Kalium-Homöostase könnte über bisher noch ungeklärte Mechanismen auch in einer Freisetzung vasoaktiver Eicosanoide münden. So demonstrierten Seeger et al. an isolierten Kaninchenlungen eine  $\alpha$ -Toxin-induzierte Hypertonie, die auf eine Stimulation des AA-Metabolismus, insbesondere eine gesteigerte Thromboxansynthese, zurückzuführen war (48). Auch im isolierten Rattenherz konnte durch  $\alpha$ -Toxin eine Freisetzung von Thromboxan provoziert werden, die zu einer Erhöhung des coronaren Perfusionsdruckes führte. Das Toxin bewirkte in diesen Experimenten weiterhin eine massive Abnahme der Herzkontraktilität (90, 119). Unklar bleibt bei diesen Untersuchungen, warum die Kontraktilität abnahm. Sibelius et al. schlugen eine thromboxanvermittelte Störung der Mikrozirkulation vor, wie sie in isolierten Lungenmodellen nachgewiesen werden konnte (90, 47). An diesen isolierten Kaninchenlungen konnte zusätzlich eine Störung der endothelialen Schrankenfunktion durch dieses Toxin mit Ausbildung eines Lungenödems ermittelt werden (117), was Untersuchungen an Endothelzellen entsprach, welche unter  $\alpha$ -Toxin-Wirkung interzelluläre Spalten formierten (123). Jedoch konnte die  $\alpha$ -Toxin-assoziierte Störung der Herzfunktion in den genannten Arbeiten nicht auf eine Ödembildung zurückgeführt werden. Die pathogenetische Relevanz des  $\alpha$ -Toxins belegen verschiedenartigste Untersuchungen nicht nur an genannten isolierten Organen und Zellen, sondern auch an Tiermodellen. So führte bei Schafen eine Injektion dieses Exotoxins zu akutem Herzversagen, welches auf eine direkte kardiotoxische Wirkung von  $\alpha$ -Toxin zurückzuführen war (118). Es kann somit davon ausgegangen werden, daß  $\alpha$ -Toxin eine wichtige Rolle bei durch *Staphylococcus aureus* verursachter Sepsis zuzukommt. Seine Rolle bei der Entstehung der septischen Kardiomyopathie konnte bisher jedoch noch nicht abschließend geklärt werden.

### 3.5.2.2 Charakterisierung und pathophysiologische Bedeutung von *Escherichia coli* Hämolysin

*E.coli* ist unbestritten der häufigste gramnegative Sepsiserreger. Es zeigte sich, daß die Pathogenität dieses Bakteriums bei extraintestinalen Infektionen stark mit der Fähigkeit zur Hämolysinsynthese verbunden ist und dieses Exotoxin einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt (124-126). *Escherichia coli* Hämolysin (ECH, früher Hämolysin A) mit einem Molekulargewicht von 107 kD wird wie  $\alpha$ -Toxin als Proteinmonomer von den Bakterien sezerniert und agiert in Zellmembranen als Porenbildner. Im Gegensatz zum  $\alpha$ -Toxin bindet es jedoch nach bisherigen Erkenntnissen nur unspezifisch, also nicht rezeptorvermittelt, an die Lipiddoppel-

schicht. Dabei spielt die Zellart keine Rolle. Unklar ist, wie es zu einer Oligomerisierung der Proteinmonomere kommt. Für die Größe der hydrophilen Pore wurde von Bhakdi et al. ein Durchmesser von ca. 2 nm angegeben, welcher eine Passage von Kalziumionen ermöglicht (113, 127). Durch diesen passiven Kalziuminflux in die Wirtszelle kann ECH eine Reihe von sekundären Zellaktionen, wie die gesteigerte Produktion von Lipidmediatoren, insbesondere der Lipoxygenaseprodukte, aktivieren (127-130). Eine wie durch  $\alpha$ -Toxin induzierte endotheliale Schrankenstörung mit interzellulärer Spaltenformation konnte auch für ECH gezeigt werden (130). Die pathologische Relevanz von ECH wurde in verschiedenen Modellen untersucht. Mäuse, denen lebende *E.coli* oder LPS injiziert wurden, zeigten eine signifikant höhere Mortalität bei hämolysinbildenden Stämmen im Vergleich zu nicht hämolysierenden *E. coli* oder LPS (124). ECH wurde auch isoliert und gereinigt in Organmodellen eingesetzt. In blutfrei perfundierten Lungen wurde durch Applikation von ECH nicht nur eine thromboxanvermittelte arterielle Hypertonie und massive Ödembildung festgestellt, sondern auch eine durch shunt-Bildung charakterisierte Mikroperfusionsstörung (49, 50). Diese Effekte konnten mit lebenden hämolysinbildenden *E. coli*, nicht aber mit Stämmen ohne Hämolysinsynthese reproduziert werden (129). Mikrozirkulationsstörungen und Ödembildung wurden auch an isoliertem Ileum unter ECH-Einfluß nachgewiesen (44). Sibelius et al. untersuchten die Wirkung von ECH auf isolierte Rattenherzen. Es zeigte sich, daß dieses Toxin nicht nur eine massive Erhöhung des coronaren Perfusionsdruckes verursachte, sondern auch die Pumpfunktion des Herzens maßgeblich beeinträchtigte. Die Vasokonstriktion im coronaren Gefäßsystem und die Kontraktilitätsstörung konnten auf eine erhöhte Lipoxygenaseaktivität mit gesteigerter Leukotriensynthese im Rattenherz zurückgeführt werden (144). Es wird deutlich, daß die Auswirkungen von ECH auf verschiedene Organe ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese der Colisepsis sind und die Virulenz gramnegativer Erreger nicht allein LPS-bedingt ist. Die Befunde der genannten Organexperimente legen weiterhin nahe, daß Endothelschäden und Mikrozirkulationsstörungen durch ECH eintreten können. Im Falle des Herzens könnte ECH zum Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie beitragen.

### **3.6 Fragestellung**

Obwohl zahlreiche Untersuchungen zur Pathogenese der septischen Kardiomyopathie Hinweise auf die Beteiligung von Perfusionsstörungen liefern, zielen nur wenige Arbeiten direkt auf die Untersuchung der Mikrozirkulation im septischen Herzen ab. Die Rolle isolierter bakterieller Exotoxine hat dabei kaum Beachtung gefunden. Mit Einsatz gefärbter Mikrosphären

sollten in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen je eines porenbildenden Exotoxins grampositiver und gramnegativer Sepsiserreger in Abwesenheit zirkulierender Effektorzellen und humoraler Faktoren auf das isolierte Rattenherz und seine regionale Perfusion bestimmt werden. Folgende Fragestellungen wurden dabei im einzelnen bearbeitet:

1. Welche Auswirkungen haben ECH und  $\alpha$ -Toxin auf die coronare Vasomotorik und Kontraktilität isoliert und zellfrei perfundierter Rattenherzen ?
2. Treten in diesem Organmodell einer exotoxinvermittelten septischen Herzschädigung Störungen der regionalen Myokardperfusion auf ?
3. Gibt es toxinspezifische Veränderungen der regionalen Perfusion ?
4. Läßt sich durch pharmakologische Interventionsversuche ein kausaler Zusammenhang zwischen exotoxinvermittelter Störung der regionalen Perfusion und Verlust der kardialen Pumpfunktion nachvollziehen ?
5. Gibt es Unterschiede in der regionalen Perfusion im Vergleich zwischen druckkonstantem mit flußkonstantem Perfusionsverfahren ?

## 4 Material und Methodik

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Tiere

Für alle Experimente wurden Wistar Ratten der Firma Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland, verwendet. Es wurden männliche Tiere mit einem Gewicht zwischen 200 und 300g gewählt.

#### 4.1.2 *Escherichia coli* Hämolyysin und *Staphylococcus aureus* $\alpha$ -Toxin

Die gereinigten Toxine wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. S. Bhakdi, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Das lyophilisierte  $\alpha$ -Toxin wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in Phosphatpuffer gelöst, aliquotiert (50  $\mu$ g/ 25  $\mu$ l) und bei -80°C gelagert. Das in Guanidinpuffer gelöste ECH wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Da im Falle des ECH die Proteinkonzentration nicht unbedingt der Menge biologisch aktiven Toxins entspricht, wurde seine Aktivität in hämolytischen Einheiten (HU) angegeben. Eine HU ist definiert als die Konzentration, die eine 60%ige Hämolyse einer 10%igen Erythrozytensuspension auslöst (128). Üblicherweise lag die 60%ige Hämolyse bei einer Verdünnung von 1:5000 vor, d.h. die Aktivität des ECH betrug definitionsgemäß 5000 HU/ml.

#### 4.1.3 Pharmaka

Folgende Pharmaka kamen zur Anwendung:

- MK 886 (Lipoxygenase-Inhibitor), Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, Kalifornien, USA
- Indomethacin (Cyclooxygenase-Inhibitor), ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Liquemin<sup>®</sup> (Heparin-Natrium), Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- Narcoren<sup>®</sup> (Pentobarbital-Natrium), Merial, Hallbergmoos, Deutschland
- Forene<sup>®</sup> (Isofluran), Abbott, Wiesbaden, Deutschland

#### 4.1.4 Material und Geräte für die Organperfusion

Folgende Materialien und Gerätschaften wurden für die Organperfusion verwendet:

- Aortenkanüle (Durchmesser: innen 1,5 mm, außen 2 mm) und Latexballon, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Brückenverstärker, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Doppelwandiges Perfusatreservoir / Oxygenator und Organkammer aus Glas, angefertigt bei Amo-Glas, Wertheim-Dertingen, Deutschland
- Druckaufnehmer, Combitrans-Transducer, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Schlauchpumpe, MS-4 Reglo 8-100, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
- Stimulationsgerät, Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
- Umwälzthermostat Thermomix ME, B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Teflon 3-Wege-Kupplung, Novodirect, Kehl, Deutschland
- Pentium Personal Computer (PC), Siemens Nixdorf, Deutschland
- AD/DA-Meßkarte PCL-818Lbip, Spectra Computersysteme, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- Labtech Notebook<sup>®</sup>-Software, Pro Version 9.02, Spectra Computersysteme, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- Krebs-Henseleit-Pufferlösung, Elektrolytlösung I/3, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland mit folgender Zusammensetzung (in mM): NaCl (125), Glucose (13,32), KCl (4,4), CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (2,4), MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O (1,3) und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1)
- Carbogen ( 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub>), Messer Griesheim, Siegen, Deutschland

#### 4.1.5 Mikrosphären

Es wurden Dye-Trak<sup>®</sup> Microspheres, Triton Technologies, San Diego, Kalifornien, USA, bezogen über Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland, eingesetzt. Die Mikrosphären wurden in 2 ml Injektionsfläschchen in den Farben Blau, Violett und Gelb geliefert. Sie lagen in einer Konzentration von 3.000.000/ml in 0,9%iger NaCl-Lösung mit 0,02% Tween 80 vor.

#### **4.1.6 Substanzen und Geräte für die Aufarbeitung der Rattenherzen**

Zur Aufarbeitung der Rattenherzen wurden folgende Geräte und Substanzen eingesetzt:

- Labsonic U Ultraschallgerät, B.Braun, Melsungen, Deutschland
- 70 % Ethanol
- 15 ml PP-Röhrchen, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
  
- 4 M Kalilauge mit 0,02% Tween, wie folgt erstellt:
  - 1000 ml Aqua destillata auf 50°C erhitzt.
  - 224,44 g Kaliumhydroxidplätzchen (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf Magnetrührer bis zur Lösung gerührt.
  - 200 µl Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat, Sigma, Deisenhofen, Deutschland ) hinzugegeben und bis zur Lösung gerührt.
  
- Natriumdesoxycholatreagenz, wie folgt erstellt:
  - 1000 ml Aqua destillata auf 50°C erhitzt.
  - Folgende Substanzen auf Magnetrührer bis zur Lösung gerührt:
    - 7,88g 0,05 M Tris (Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland)
    - 500 µl Tween 80 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
    - 0,1g Natriumazid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
  - pH-Wert mit NaOH auf 8,5 eingestellt.
  - 20,73g Natriumdesoxycholat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hinzugefügt und auf Magnetrührer bis zur Lösung gerührt.
  - pH wiederum mit NaOH auf 8,5 eingestellt.

#### **4.1.7 Material und Geräte zur Ermittlung der Mikrosphärenanzahl**

Folgende Materialien und Geräte wurden zur Ermittlung der Mikrosphärenzahl verwendet:

- N,N-Dimethylformamid (DMF), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Uvikon 922A Spektrophotometer, Kontron Instruments, Milano, Italien
- Ultra-Mikro-Quarzküvetten, 160µl, 15mm Zentrumshöhe, Bio-Tek-Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland

- Pentium Personal Computer (PC), Siemens Nixdorf, Deutschland
- Matrixinversionsprogramm, Eigenprogrammierung in Pascal

#### **4.1.8 Enzymatische Test-Kits**

Zur Bestimmung einer möglichen LPS-Kontamination der Toxine wurde der Limulus Amebocyte Lysate Test QCL-1000 der Firma BIO Whittaker, Walkersville, Maryland, USA, verwendet.

## **4.2 Methodik**

### **4.2.1 Die Perfusion isolierter Rattenherzen**

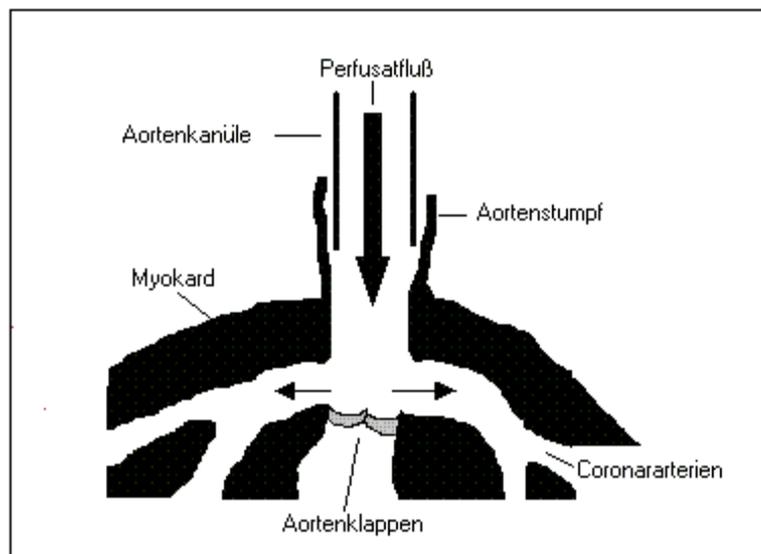
#### 4.2.1.1 Prinzip der Perfusion isolierter Herzen nach O. Langendorff

Bei der 1895 von dem Physiologen O. Langendorff entwickelten Methodik zur Perfusion von Herzen werden diese retrograd perfundiert (132). Dies bedeutet eine am isolierten Organ über den Aortenstumpf vorgenommene Perfusion. Voraussetzung dafür ist die intakte Ventilfunktion der Aortenklappen, die ein Abfließen des in den Aortenstumpf eingeleiteten Perfusats in den linken Ventrikel verhindert. Das Perfusat wird so nur in die oberhalb der Klappen abzweigenden Coronararterien geleitet (s. Abb.4). Dies gewährleistet eine Versorgung des Myokards und man erhält aufgrund des intakten Reizleitungssystems eine spontan schlagende Herzpräparation bei leeren Herzkammern. Die Präparation ermöglicht unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Untersuchungen am Herzen.

#### 4.2.1.2 Organentnahme, Präparation und Perfusion

Die Ratten wurden zur Organentnahme zunächst mit Isofluran (Forene®) in Inhalationsnarkose gelegt. Das Isofluran wurde dazu in den abgedichteten Käfig gegeben und nach Wirkung dosiert. Danach wurde die Narkose durch Pentobarbital (Narcoren®, 0,35 g/kg Körpergewicht) fortgesetzt. Zur Vermeidung von Thrombenbildung in den Coronarien wurden die Tiere gleichzeitig mit Heparin (Liquemin®, 1000 IU/kg Körpergewicht) vorbehandelt. Die Applikation dieser beiden Pharmaka erfolgte über intraperitoneale Injektion. In tiefer Narkose

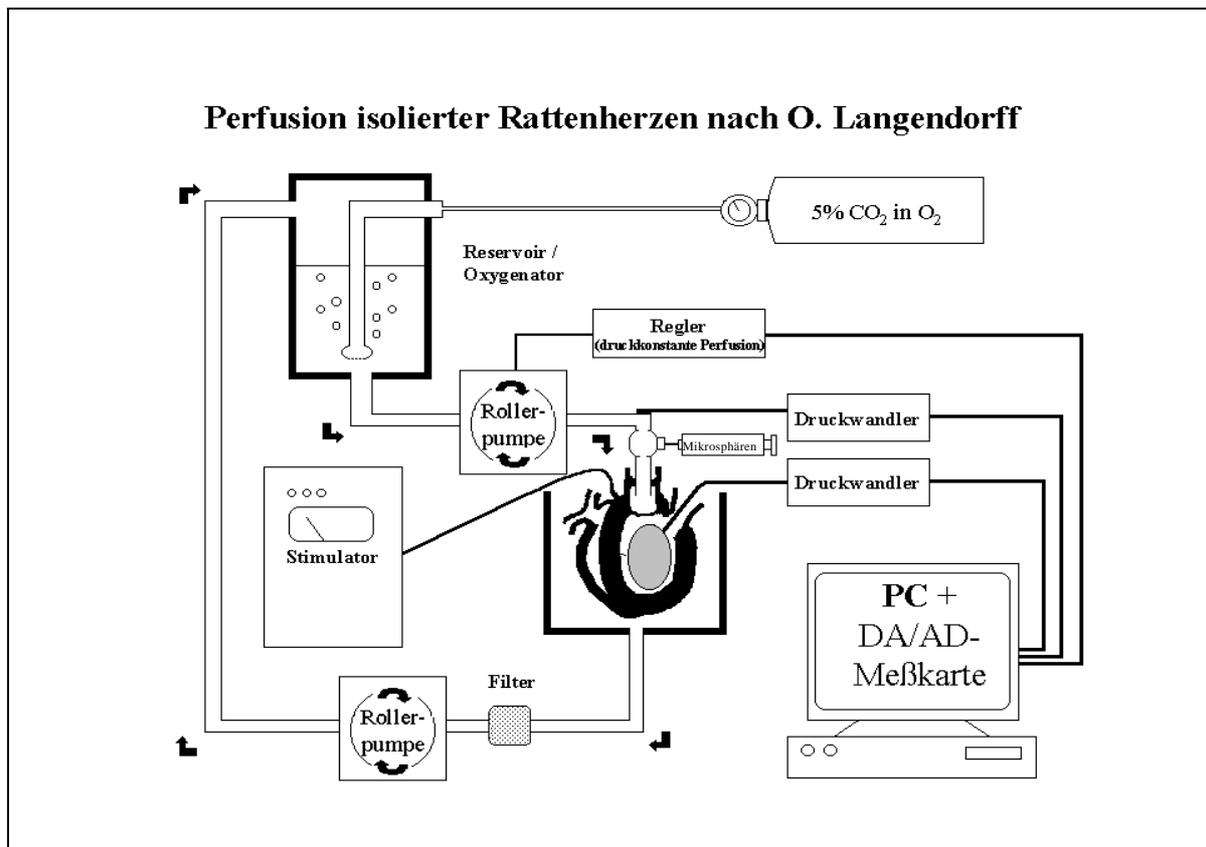
wurde im Nabelbereich eine Inzision in die Bauchwand vorgenommen und bilateral bis auf Zwerchfellhöhe fortgesetzt. Das Zwerchfell wurde eröffnet, der Thorax beidseits der Medianen durchtrennt und nach cranial aufgeklappt.



**Abb.4:** Prinzip der Langendorff-Perfusion

Das Herz wurde mit einem Scherschlag von den großen Gefäßen getrennt, so daß ein möglichst langer Aortenstumpf verblieb und sofort in eine flache Schale mit eisgekühlter Krebs-Henseleit-Pufferlösung verbracht. Es verfiel dadurch augenblicklich in eine Kältekardioplegie, die dazu diente, Perikard- und Thymusreste abzuräparieren. Gefäßstümpfe der Lungenvenen wurden soweit entfernt, daß ein freier Zugang zum linken Vorhof und Ventrikel möglich war. Die Entnahme des Rattenherzens dauerte ca. 35 Sekunden. Nun wurde der Aortenstumpf auf die Aortenkanüle aufgezogen und mit einer Ligatur fixiert. Die Kanüle war bereits fest an der Apparatur angebracht und lieferte 37°C warmes Perfusat. Nachdem die Kältekardioplegie aufgehoben und das Herz mit 150 ml Perfusat von sämtlichen Blutresten freigespült worden war, wurde es, frei an der Kanüle schlagend, in die auf 37°C temperierte Organkammer gebracht. Das Perfusat für alle Experimente bestand aus einer Krebs-Henseleit-Pufferlösung. Die Lösung wurde mit  $\text{NaHCO}_3$  (25 mM) versetzt und in einem temperierten Perfusatreservoir (Oxygenator) kontinuierlich mit Carbogen begast, so daß sich ein  $\text{pO}_2$  von 500 +/- 45 mmHg, ein  $\text{pCO}_2$  von 35 +/- 5 mmHg und ein pH von 7,4 +/- 0,05 einstellte. Die Temperatur betrug dabei 37° C. Das temperierte und begaste Perfusat wurde mit einer Rollerpumpe in den Aortenstumpf eingeleitet. Den Abfluß aus dem Herzen fand das Perfusat über die Herzhöhlen und die eröffneten Gefäße, wonach es vom Organ in die Organkammer abtropfte. Das Herz wurde mit der bipolaren Elektrode eines Stimulators auf eine Herzfrequenz

von 300-400 Schlägen pro Minute eingestellt. Im Rahmen dieser Arbeit kamen unterschiedliche Perfusionsverfahren zum Einsatz: In der **offenen Perfusion** wurde das abtropfende Perfusat verworfen. Dabei wurde das Reservoir über einen zweiten Weg der Schlauchpumpe kontinuierlich mit Perfusat nachgefüllt. In der **rezirkulierenden Perfusion** wurde das ablaufende Perfusat durch einen Filter mit 15µm Porengröße über einen zweiten Weg der Schlauchpumpe wieder in das Reservoir zurückgeführt (s. Abb.5).



**Abb.5:** Versuchsapparatur zur Perfusion isolierter Rattenherzen nach Langendorff. Über Rollerpumpen wird das begaste und temperierte Perfusat zum Herz und zurück in das Reservoir geleitet. Per PC wird der Druck auf dem in der linken Herzkammer platzierten Latexballon sowie der Perfusionsdruck in der Aortenkanüle erfaßt. Die Injektion der Mikrosphären erfolgt oberhalb der Aortenkanüle. Das Herz wird mit dem Stimulator auf einer konstanten Frequenz gehalten.

In der **flußkonstanten Perfusion** wurde das Rattenherz mit einem coronaren Perfusatfluß (CPF) von 10-12 ml/min/g Herzgewicht perfundiert. Änderungen des coronaren Gefäßwiderstandes durch einen veränderten Tonus der glatten Muskulatur im coronaren Gefäßsystem bewirkten hierbei nach der Formel **Perfusionsdruck » Gefäßwiderstand / Perfusatfluß (konstant)** Änderungen des coronaren Perfusionsdruckes (CPP).

In der **druckkonstanten Perfusion** wurde ein CPP von 75 mmHg aufrechterhalten. Änderungen des Gefäßwiderstandes bewirkten hier nach der Formel *Perfusatfluß » Perfusionsdruck (konstant) / Gefäßwiderstand* eine Veränderung des CPF.

#### 4.2.1.3 Messungen physiologischer Parameter an isolierten Rattenherzen

Eine Abzweigung kurz über der Aortenkanüle zu einem Druckmeßsystem (Combitrans Transducer) ermöglichte die Registrierung des CPP. Über einen Brückenverstärker wurde das Signal des Druckaufnehmers amplifiziert und in einem PC verarbeitet. Bei flußkonstanter Perfusion wurde der Verlauf des CPP als Maß des coronaren Gefäßwiderstandes registriert. Bei druckkonstanter Perfusion ermöglichte die in den PC integrierte Meßkarte nicht nur die ständige Registrierung des CPP, sondern über ihren analogen Ausgang und die analoge Schnittstelle der Pumpe auch eine kontinuierliche Steuerung der Pumpleistung, so daß durch ständige Anpassung der Pumpgeschwindigkeit der vorgegebene CPP von 75 mmHg aufrechterhalten wurde. Messung des CPP und Anpassung der Pumpgeschwindigkeit erfolgten mit 250 Hz. Aus der Pumpgeschwindigkeit, die an der analogen Schnittstelle in Form von Spannungsimpulsen aufgegriffen wurde, konnte nach Kalibrierung des Schlauchsystems der CPF ermittelt werden. Bei druckkonstanter Perfusion wurde der Verlauf des CPF als Maß des coronaren Gefäßwiderstandes registriert. In den linken Ventrikel des Herzens wurde über den linken Vorhof ein mit Aqua destillata gefüllter Latexballon eingeführt, der über einen Schlauch ebenfalls mit einem Druckmeßsystem gekoppelt war. Der Ballon wurde mit so viel Flüssigkeit gefüllt, daß er den Ventrikel ausfüllte und ein enddiastolischer Druck von 0 mmHg gemessen wurde. Durch die isovolumetrische Kontraktion des Ventrikelmyokards auf dem Latexballon konnte so der linksventrikuläre systolische und diastolische Druck (LVP) als Maß der Kontraktilität bestimmt werden. Auch hier wurde über einen Brückenverstärker das Signal des Druckaufnehmers amplifiziert und im PC verarbeitet. Der Verlauf des linksventrikulären Druckes (LVP) wurde registriert. Aus diesen Daten wurde zusätzlich die Herzfrequenz (HR), der effektiv aus systolischem abzüglich diastolischem Druck errechnete linksventrikuläre Druckanstieg (left ventricular developed pressure, LVDP) und die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) ermittelt und als differenzierte Kontraktilitätsparameter ebenfalls aufgezeichnet. Obwohl das Rattenherz spontan schlug, wurde auf den rechten Vorhof die bipolare Elektrode eines Stimulators gesetzt. Die Herzen wurden mit einer Frequenz oberhalb ihrer Eigenfrequenz stimuliert. Dies gewährleistete eine gleich-

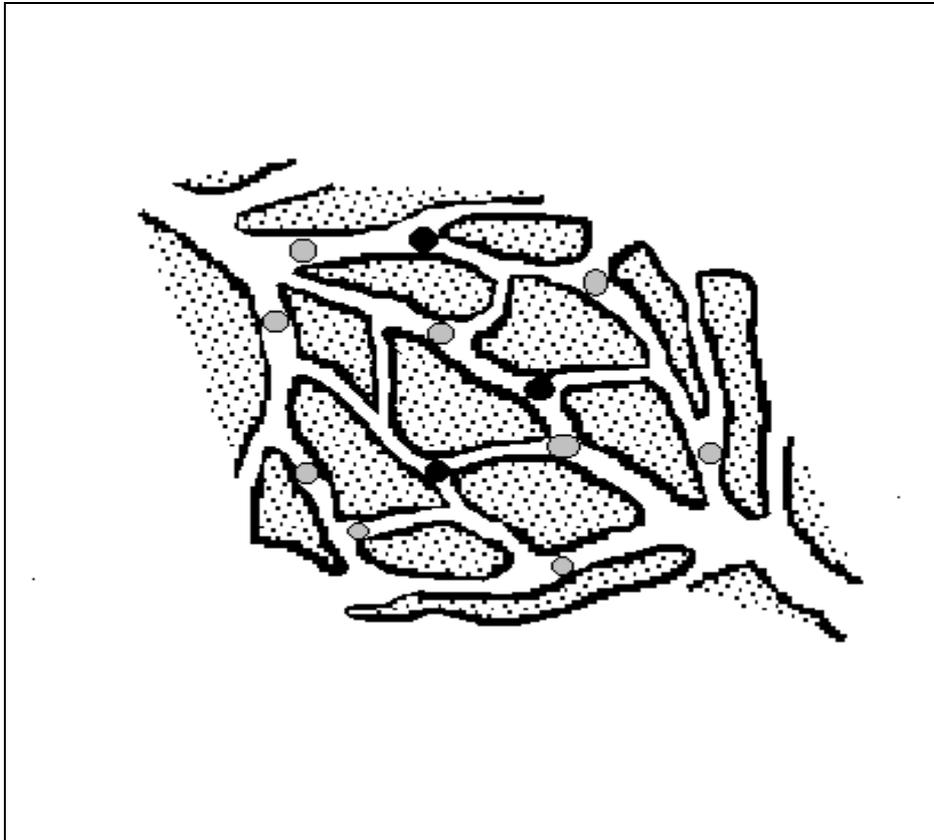
bleibende Herzfrequenz für die ganze Versuchsdauer ohne frequenzabhängige Veränderungen des LVP.

## **4.2.2 Einsatz gefärbter Mikrosphären am isolierten Rattenherz**

### 4.2.2.1 Prinzip der Bestimmung des regionalen Perfusionsflusses mit gefärbten Mikrosphären

Bei den verwendeten Dye-Trak<sup>®</sup> Mikrosphären handelt es sich um 15 +/- 0,2 µm große, gefärbte Polystyrenkugeln. Diese können in Gefäße injiziert werden, wobei sie aufgrund ihrer Größe die Mikrozirkulation der versorgten Organe nicht passieren können und die Kapillaren embolisieren. Die Embolisationsrate ist proportional zur regionalen Perfusion, d.h. je mehr ein Gewebeabschnitt durchblutet bzw. perfundiert wird, desto mehr Mikrosphären bleiben im Kapillargebiet hängen. Bis zu einem gewissen Maß beeinträchtigt dieser Vorgang nicht die Organfunktion (s. 4.2.2.8.2.). Nach anschließender Dissektion des zu untersuchenden Gewebes (s. 4.2.2.2.) können die in ihnen befindlichen Mikrosphären zurückgewonnen werden. Dazu bedarf es einer kompletten Auflösung der einzelnen Gewebeprobe und anschließender Rückgewinnung der Mikrosphären (s. 4.2.2.3.). Die Anzahl zurückgewonnener Mikrosphären ist ein Maß der durch den entsprechenden Gewebeanteil geflossenen Blut- oder Perfusatmenge zum Zeitpunkt der Mikrosphäreninjektion (hier: regionaler myokardialer Perfusionsfluß, RMF). Um diese zu ermitteln, muß durch das Lösungsmittel Dimethylformamid (DMF) die Farbe der Mikrosphären ausgelöst und ihre Intensität spektrophotometrisch bestimmt werden. Über die Farbintensität lassen sich die Mikrosphären quantifizieren. Durch Injektion verschiedenfarbiger Mikrosphären zu unterschiedlichen Zeitpunkten besteht die Möglichkeit, Veränderungen des RMF zu diesen Zeitpunkten, z.B. vor und nach Gabe eines Pharmakons, in demselben Strombahngebiet zu ermitteln (s. Abb.6). Das Absorptionsspektrum des dadurch entstehenden Farbgemisches (s. Abb.9) wird im Spektrophotometer im Bereich von 320-820 nm in Absorptionseinheiten (AU) gemessen ( $1 \text{ AU} = -\lg [10\% \text{ Lichttransmission} / 100\%]$ ). Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Absorption direkt proportional zur Farbkonzentration. Diese wiederum ist direkt proportional zur Mikrosphärenzahl. Mit dem PC kann der Anteil unterschiedlich gefärbter Mikrosphären aus dem Farbgemisch heraus über die gemessene Absorption quantifiziert werden. Hierzu dient ein Matrixinversionsprogramm, in dem jede Farbe durch eine Wellenlänge (Blau 672 nm, Violett 598 nm, Gelb 448 nm) charakterisiert ist. Das zusammengesetzte Spektrum einer Mischprobe wird mit Einzelspektren definierter Mikrosphärenzahlen der jeweiligen Farbe (s. Abb.8, 9) im Matrixinversionsprogramm

verglichen (s. 4.2.2.5.) und daraus die absolut enthaltene Mikrosphärenanzahl jeder Farbe berechnet. Die Mikrosphärenzahl dient zur Berechnung des RMF (s. 4.2.2.4.) in ml/min/g. Jede Farbe repräsentiert den RMF zu einem anderen Zeitpunkt.

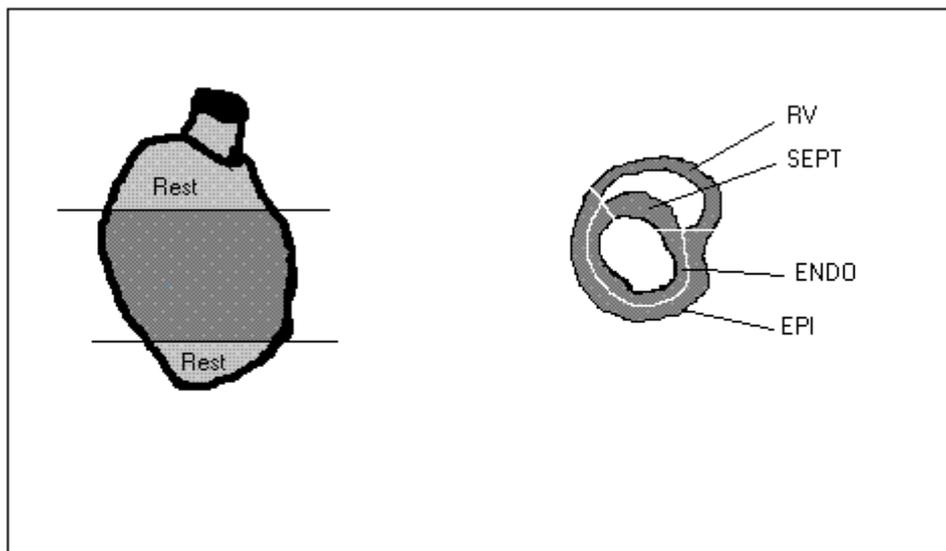


**Abb.6:** Schematische Darstellung unterschiedlich gefärbter Mikrosphären in einem Kapillargebiet. Die hellen Mikrosphären wurden zu einem Zeitpunkt mit intensiver Perfusion angespült, während die dunklen zu einem späteren Zeitpunkt mit geringerer Perfusion dazukamen.

#### 4.2.2.2 Dissektion des Myokards in unterschiedliche mikrozirkulatorische Bereiche

Zur Untersuchung der regionalen Perfusion verschiedener Myokardbereiche wurde nach Versuchsende das Rattenherz in anatomisch definierte Bereiche zerteilt (s. Abb.7). Endo- und epikardiale Myokardanteile des linken Ventrikels fanden dabei besondere Berücksichtigung. Mit einem Skalpell wurden die Vorhöfe unterhalb der Ventilebene sowie die Herzspitze abgetrennt. Vom verbliebenen Anteil wurde die rechte Ventrikelwand und das Septum gelöst. Die freie linke Ventrikelwand wurde in einen endo- und epikardialen Anteil geteilt. Es ergaben sich somit fünf Gewebeproben: Der endokardiale (ENDO) und epikardiale (EPI) Anteil der linken Ventrikelwand, das Septum (SEPT) und die rechte Ventrikelwand (RV). Vorhöfe mit

Gefäßstämmen und die Herzspitze wurden als eine Probe zusammengefaßt (REST). Diese fünf Proben wurden anschließend gewogen und entsprechend 4.2.3.4. weiterverarbeitet.



**Abb.7:** Dissektion des Herzens. Die hellgrau dargestellten Anteile wurden als REST zusammengefaßt (links). Die dunkelgrau makierte Scheibe wurde in die übrigen Proben weiter zergliedert (rechts).

#### 4.2.2.1 Rückgewinnung der Mikrosphären aus den Myokardproben

Zur Rückgewinnung der Mikrosphären aus dem Gewebe mußte dieses zunächst mittels alkalischer Hydrolyse aufgelöst werden. Anschließend wurden durch verschiedene Reinigungsschritte die Mikrosphären isoliert.

Die Herzgewebeproben wurden in 15 ml PP-Röhrchen mit 4 ml 2 molarer Kaliumhydroxidlösung, versetzt mit 0,02% Tween, bei 60°C für 1,5 h lysiert. Alle 15 min wurden dabei die Röhrchen kurz geschüttelt. Danach war das Gewebe vollständig aufgelöst, wogegen die Mikrosphären noch unversehrt in der Lösung vorlagen. Es schloß sich eine 20 s lange Ultraschallbehandlung zwecks Auflösung übriggebliebener Zellbestandteile an. Die PP-Röhrchen wurden mit Aqua destillata auf 9 ml aufgefüllt und bei 1500g 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen mit 3 ml Natriumdesoxycholatreagenz gefüllt und erneut ultraschallbehandelt, so daß die entstandenen Pellets sich vollständig lösten. Die Proben wurden wiederum zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die PP-Röhrchen wurden nun mit 3 ml 70%igem Ethanol gefüllt, abermals ultraschallbehandelt und zentrifugiert. Nach Beseitigung des Überstandes wurden die so aufgearbeiteten Mikrosphären unter einem konti-

nuierlichen Stickstoffstrom 1 h getrocknet. Dann schloß sich die Lösung der Farbe aus den Mikrosphären mit 200µl DMF in jedem PP-Röhrchen an. Nach einer weiteren Zentrifugation (4 min, 2000g) wurde der farbige Überstand abgenommen und die Absorption spektrophotometrisch bestimmt.

#### 4.2.2.2 Berechnung der regionalen myokardialen Perfusion

Zur Berechnung der regionalen myokardialen Perfusion kam folgende Formel zum Einsatz:

$$\text{RMF}_{\text{Farbe}} = \text{CPF} \times [ (\text{MS}_{\text{Probe}} \times 1000) : (\text{MS}_{\text{gesamt}} \times \text{Gewicht}_{\text{Probe}}) ]$$

Für jede der fünf Myokardproben erfolgte die Berechnung einzeln und unterteilte sich nochmals in die drei eingesetzten Farben, so daß pro Herz 15 RMF errechnet wurden.

$\text{RMF}_{\text{Farbe}}$  = regionaler myokardialer Perfusionsfluß zu einem der drei bestimmten Zeitpunkte

CPF = coronarer Perfusionsfluß zum Zeitpunkt der Mikrosphäreninjektion in ml/min

$\text{MS}_{\text{Probe}}$  = ermittelte Mikrosphärenanzahl in einer Probe

$\text{MS}_{\text{gesamt}}$  = Summe aller  $\text{MS}_{\text{Probe}}$  aus einem Herz

$\text{Gewicht}_{\text{Probe}}$  = Gewicht der einzelnen Myokardprobe in mg

1000 = Umrechnungsfaktor von mg zu g

#### 4.2.2.3 Erstellung standardisierter Absorptionsspektren einzelner Farben

Aus jeder Charge Dye-Trak<sup>®</sup> Mikrosphären mußten zunächst Standardabsorptionsspektren der verwendeten Farben für die Matrixinversion erstellt werden. Dazu wurde eine bekannte Anzahl von Mikrosphären einer Farbe in DMF gelöst und die Absorption im Spektrophotometer (320-820 nm) bestimmt. Der Vergleich der entstandenen Absorptionskurven jeder einzelnen Farbe (Abb.8) mit der eingesetzten Mikrosphärenmenge diente als Standard für das Matrixinversionsprogramm, welches dadurch auch überlagerte Absorptionskurven verschiedener Farben berechnen konnte. Die Standards wurden wie folgt erstellt:

Die in einer tweenhaltigen 0,9%igen Natriumchloridlösung mit einer Konzentration von 3000.000/ml gelieferten Mikrosphären wurden der Originalpackung steril entnommen und in

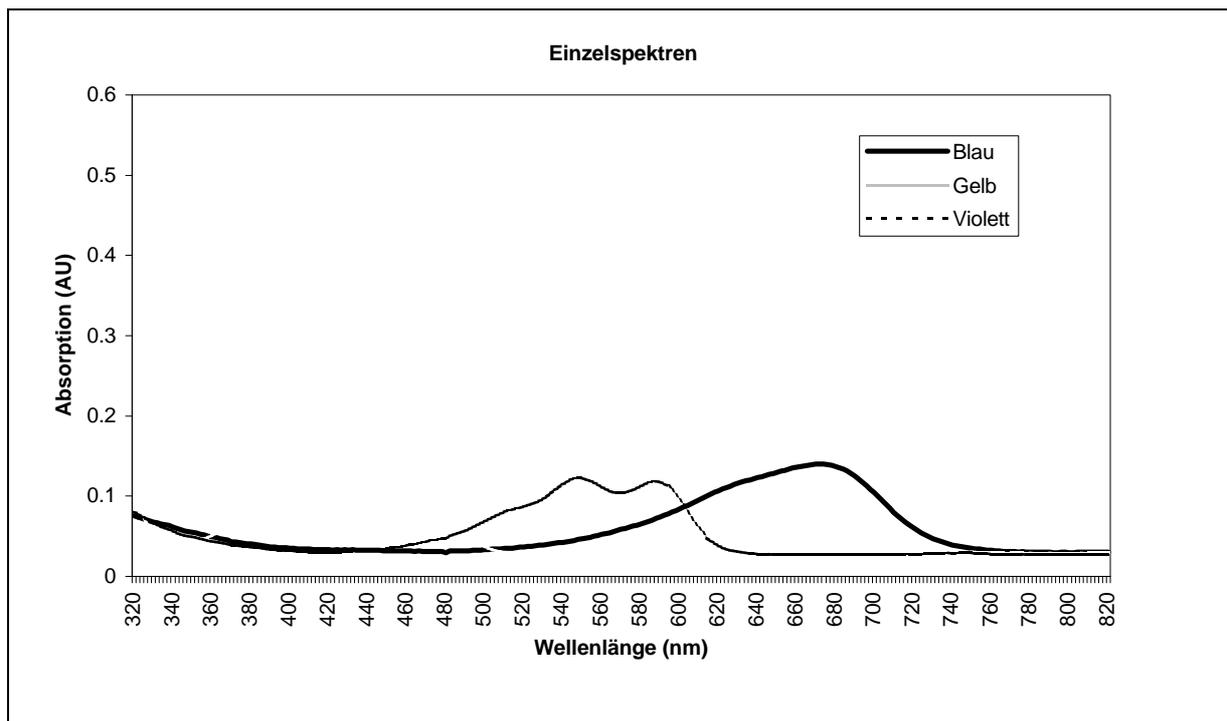
Natriumchlorid-Tween-Lösung so verdünnt, daß in 200µl der Verdünnungslösung 2000 Mikrosphären vorhanden waren. 200µl dieser verdünnten Lösung jeder Farbe wurden in je ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden bei 2000g 4 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die verbliebenen Mikrosphärenpellets unter Stickstoff getrocknet. Das Trocknen gewährleistete, daß bei anschließender Auslösung der Farbe mit DMF kein Verdünnungseffekt durch die Trägerlösung stattfand. Es wurde 200µl DMF zur Lösung verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden wiederum zentrifugiert, um die nun farblosen Mikrosphären aus dem gefärbten DMF zu entfernen. Der farbige Überstand wurde abgenommen und im Spektrophotometer gemessen. Die Meßdaten wurden als Standard für das Matrixinversionsprogramm verwendet und für 2000 Mikrosphären definiert. Es wurden die Farben Blau, Violett und Gelb eingesetzt.

#### 4.2.2.4 Bestimmung der Meßgenauigkeit

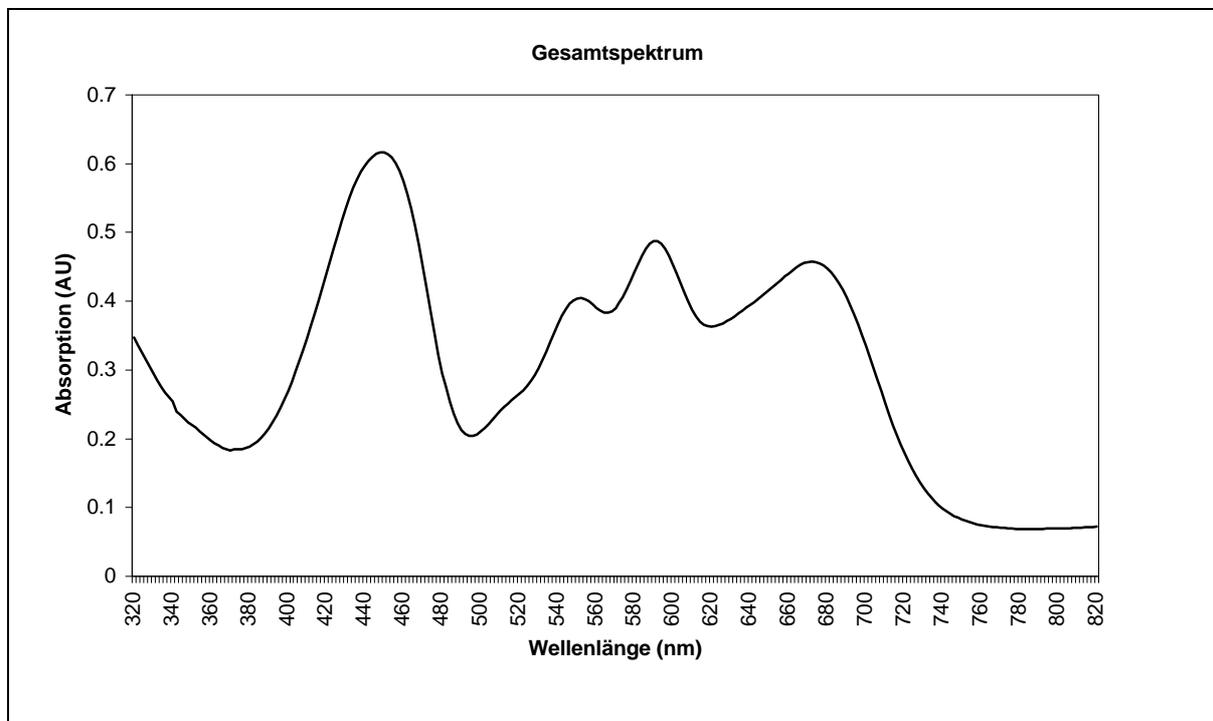
Um vor Beginn der Untersuchungen die Meßgenauigkeit des vorliegenden Systems zu überprüfen, wurden mit Mikrosphäremischungen unterschiedlicher Anzahl und Farben Konzentrationsreihen erstellt. Von obengenannter Verdünnung wurden 50, 100, 250, und 500µl pro Farbe entnommen und miteinander gemischt. Dies entsprach einer Mikrosphärenanzahl von 1500, 3000, 7500, und 15000. Diese Gemische wurden wie in 4.2.2.5. aufbereitet und gemessen. Es ergaben sich für die einzelnen Farben mittlere Differenzen von 0 bis +/-19,4% vom Sollwert mit geringen Standardabweichungen (s.Abb.10).

#### 4.2.2.5 Einflüsse des Rückgewinnungsprozesses auf die Mikrosphärenwiederfindung

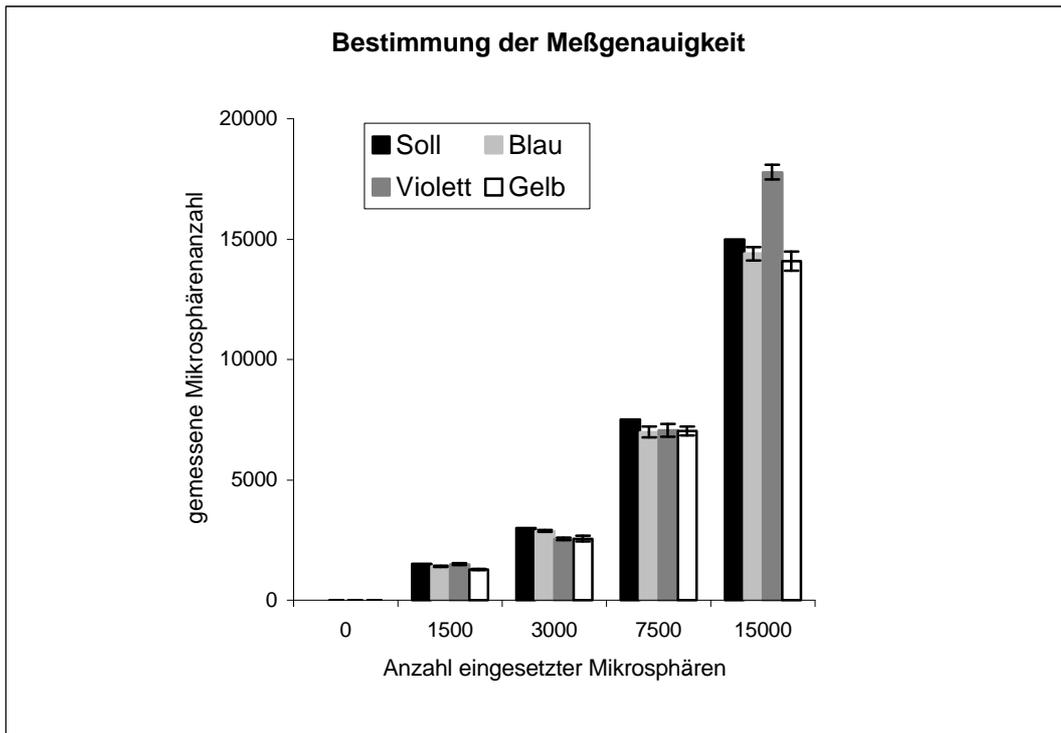
Zur Rückgewinnung der Mikrosphären aus dem Herzgewebe ist ein relativ aufwendiges Verfahren erforderlich (s. 4.2.2.3.). Um Einflüsse der verschiedenen Reagenzien sowie eventuelle Verluste an Mikrosphären durch diese Prozedur bestimmen zu können, wurde vor deren Einsatz in Perfusionen der Rückgewinnungsprozeß mit nicht im Gewebe befindlichen Mikrosphären nachgestellt. Kleine Mengen Rattenherzmuskulatur wurden in 15 ml PP-Röhrchen gegeben. Von jeder Mikrosphärenfarbe wurden zu diesen Proben bekannte Mikrosphärenanzahlen zugesetzt, entsprechend 4.2.2.6. 1500, 3000, 7500 und 15000 Mikrosphären. Danach wurde der Rückgewinnungsprozeß aus 4.2.2.3. vorgenommen und die gefundenen Mikrosphären gemessen. Es zeigte sich, daß bei jeder Farbe niedrigere Anzahlen gemessen wurden, als in 4.2.2.6. (s. Abb.11), wobei die größten Differenzen bei den gelbgefärbten Mikrosphären ermittelt wurden.



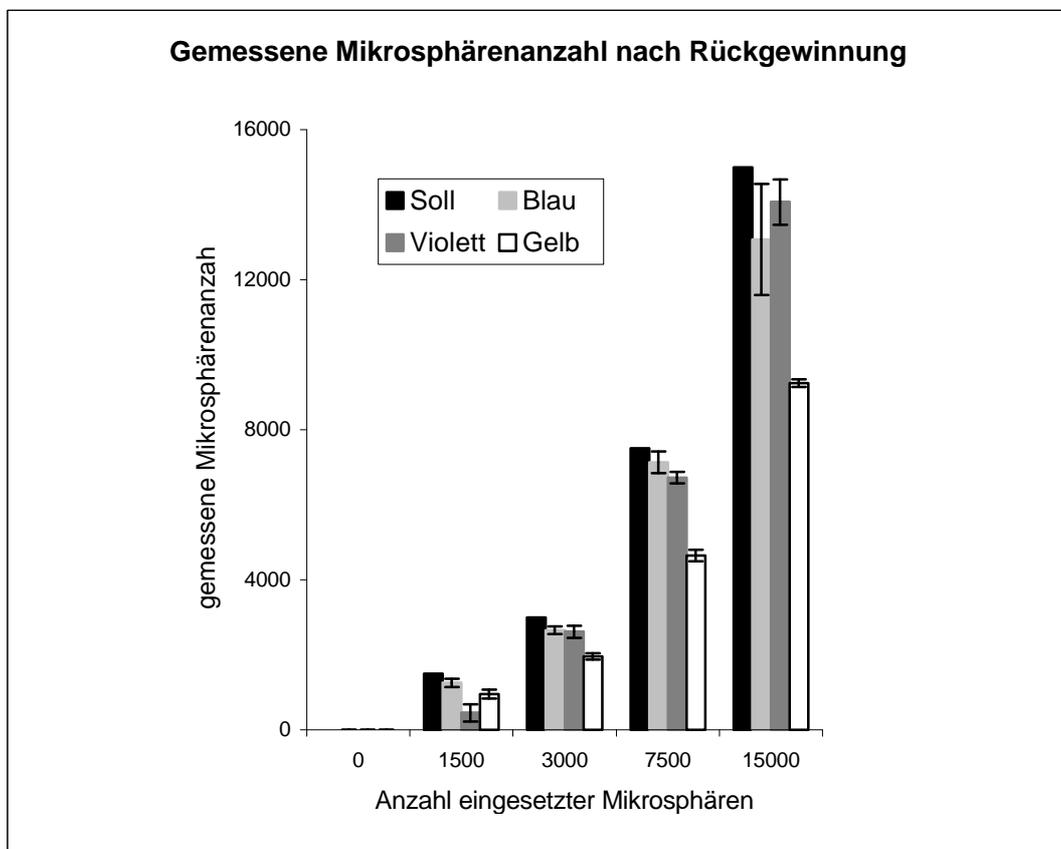
**Abb.8:** Einzelpektren der drei verwendeten Farben. Die Farbkonzentrationen in 200 $\mu$ l DMF entstammte aus 2000 Mikrosphären jeder Farbe.



**Abb.9:** Zusammengesetztes Spektrum eines Farbgemisches. Es ist erstellt aus den Mikrosphären einer Myokardprobe, gelöst in 200  $\mu$ l DMF.



**Abb.10:** Bestimmung der Meßgenauigkeit des Systems. *Direkt in DMF eluierte Mikrosphären wurden photometrisch gemessen und anschließend quantifiziert. Die Mittelwerte +/- SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.*



**Abb.11:** Verluste von Mikrosphären nach Rückgewinnung aus Gewebeproben. *Die Mittelwerte +/- SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.*

Die Differenz vom Sollwert betrug hier -4,8% bis -38,4% mit geringen Standardabweichungen. Dieser Verlust kommt bei der Berechnung der regionalen Perfusion aber nicht zum tragen, da dort der Quotient aus  $MS_{\text{Probe}} / MS_{\text{gesamt}}$  verwendet wird (s. 4.2.2.4).

#### 4.2.2.6 Dosierung der Mikrosphären

##### 4.2.2.6.1 Überlegungen zur Dosierung

Voraussetzung zur Bestimmung des RMF ist die uneingeschränkte Funktion des Rattenherzens. Die Anzahl der injizierten Mikrosphären darf nicht so hoch sein, daß durch die Embolisierung der Kapillaren die Versorgung des Gewebes eingeschränkt wird. Gleichzeitig muß sie aber so hoch sein, daß in den späteren Einzelproben statistisch aussagekräftige Berechnungen möglich sind. Laut Hersteller liegt die kritische Grenze bei 400 Mikrosphären einer Farbe in einer Probe. In der vorliegenden Arbeit enthielten die Proben ca. 1000 bis 5000 Mikrosphären pro Farbe. Für die Lösung von Mikrosphärenfarbe in DMF bestehen weiterhin Maximalgrenzen, da die Linearität zwischen Mikrosphärenzahl und im Spektrophotometer gemessener Absorption über 1,3 AU nicht mehr gewährleistet ist. Dies entspricht 12000 blauen, 15000 violetten und 3000 gelben Mikrosphären in 100µl DMF (Dye-Trak<sup>®</sup>-Produktinformation). Für die Injektion in Rattenherzen wird eine Menge von 10000 – 20000 Mikrosphären als geeignet angesehen (130). In Vorexperimenten wurden Injektionen von 10000, 15000 und 20000 Mikrosphären erprobt (n=3). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Bestimmung des RMF bei diesen drei Dosierungen.

##### 4.2.2.6.2 Einfluß der Mikrosphäreninjektion auf die Herzfunktion

Die Mikrosphären wurden in 250µl 0,9%iger, mit 0,02% Tween versetzter NaCl- Lösung gut suspendiert und mit einer 1 ml- Spritze in den freien Weg der Teflonkupplung injiziert. Dies erfolgte bei laufender Perfusion. Die Auswirkungen der Injektion dieser Lösung sowie der enthaltenen Anzahl an Mikrosphären auf physiologische Parameter des Rattenherzens wurden erprobt. Zunächst wurde mehrfach mikrosphärenfreie Lösung injiziert. Danach erfolgte in mehreren Experimenten die dem Versuchsablauf (s. 4.2.3.) entsprechende Injektion von 10000, 15000 und 20000 Mikrosphären. Die Injektionen erfolgten blasenfrei. Bei fluß- und

druckkonstanter Perfusion zeigte sich ein reversibler Abfall des LVDP um 3-5 mmHg. Nach ca. 30 s wurde das Ausgangsniveau wieder erreicht. Die Mikrosphären hatten in keiner Dosierung nachhaltigen Einfluß auf CPP, CPF, LVP und  $dP/dt$ . Es wurde offen perfundiert. Für weitere Experimente wurde eine Anzahl von 15000 Mikrosphären gewählt.

#### 4.2.2.7 Einflüsse der rezirkulierenden Perfusion

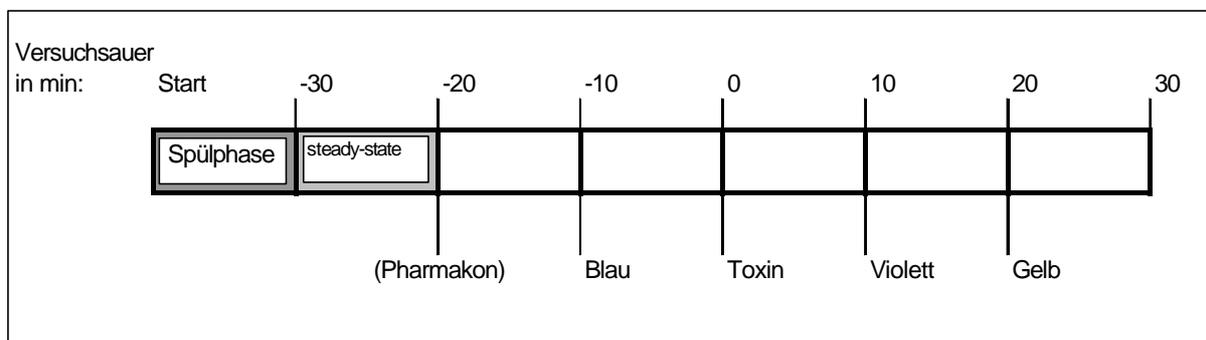
Da die isolierten Exotoxine nicht in unbegrenzter Menge zur Verfügung standen, wurde das rezirkulierende Perfusionsverfahren angestrebt. Es ermöglicht einen gleichbleibenden Toxinspiegel bei Einsatz einer wesentlich geringeren Toxinmenge, als es in der offenen Perfusion erforderlich wäre. Mögliche Einflüsse von eventuell rezirkulierenden Mikrosphären oder Tween 80 auf die Herzphysiologie und die RMF- Bestimmung mußten im rezirkulierenden Verfahren zunächst untersucht werden: Die Untersuchung des organeffluenten Perfusates während und nach der Injektion ergab keinen meßbaren Gehalt an Mikrosphären. Die physiologischen Parameter des Rattenherzens im zweistündigen Verlauf der rezirkulierenden Perfusion änderten sich nicht nachhaltig durch wiederholte Mikrosphäreninjektionen. Die Bestimmung des RMF durch gefärbte Mikrosphären wies im Vergleich beider Verfahren keine signifikanten Unterschiede auf. Die rezirkulierende Perfusion konnte somit unbedenklich eingesetzt werden. Das offene Perfusionsverfahren fand aus obenstehenden Gründen keine weitere Verwendung.

#### 4.2.3 Standardversuchsprotokoll

Nach Fixation des Rattenherzens an der Aortenkanüle wurde es zunächst mit 150 ml Perfusat offen perfundiert. Dies hatte den Zweck, das Organ von sämtlichen Blutresten zu befreien, bevor das organeffluente Perfusat rezirkuliert wurde. Zur Rezirkulation wurde das abtropfende Perfusat in der beheizten Organkammer aufgefangen und in den Oxygenator zurückgepumpt. Die Versuchsdauer betrug von diesem Zeitpunkt an 60 min, wobei der Zeitpunkt der Toxinexposition nach halbstündiger Rezirkulation mit 0 bezeichnet wurde. Zunächst hatte das Herz weitere 10 min zur Erreichung des „steady- state“: Nach diesem Zeitraum zeigte es konstante physiologische Parameter (CPP/ CPF, LVDP,  $dP/dt_{max}$ ). Herzen, deren Parameter keine Konstanz aufwiesen, wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. In den pharmakologischen Untersuchungen wurde zum Zeitpunkt -20 min das Pharmakon in das Reservoir appliziert. Zum Zeitpunkt -10 min erfolgte die Injektion von blauen Mikrosphären,

bei 0 min wurde (mit Ausnahme der Kontrollen) das bakterielle Toxin als Bolus in das Reservoir gegeben. Im Abstand von 10 min erfolgten dann zwei weitere Mikrosphäreninjektionen, erst Violett, dann Gelb.

Nach 30-minütiger Toxinperfusion wurde die Aufzeichnung beendet, das Herz abgehängt und den weitergehenden Untersuchungen unterzogen. Es ergaben sich so drei Zeitpunkte, zu denen die Bestimmung des regionalen myokardialen Perfusionsflusses möglich war. Der erste (Blau) repräsentierte die regionale Perfusion vor den toxininduzierten Veränderungen, die weiteren (Violett und Gelb) die Veränderungen der regionalen Perfusion durch Toxingabe. Bei Einsatz eines Pharmakons wurde dies frühzeitig eingesetzt, um eine ausreichende Wirkungszeit zu gewährleisten. Der Versuchsablauf ist in Form eines Zeitstrahls in Abb.12 dargestellt.



**Abb.12:** Versuchsablauf

Folgende Gruppen mit jeweils mindestens 4 unabhängigen Experimenten wurden jeweils **flußkonstant** und **druckkonstant** durchgeführt:

- Kontrolle (die Kontrollgruppen in den Abb. 13-22 und Tab. 3 und 4 sind un-
- behandelte Herzen)
- $\alpha$ -Toxin (1 $\mu$ g/ml)
- Indomethacin (250 $\mu$ M) +  $\alpha$ -Toxin (1 $\mu$ g/ml)
- ECH (0,25 HU/ml)
- MK 886 (7,5 $\mu$ M) + ECH (0,25 HU/ml)

Es wurden folgende **weitere Kontrollexperimente** (n  $\geq$  3) durchgeführt:

- Indomethacin (250 $\mu$ M)
- MK 886 (7,5 $\mu$ M)
- DMSO (0,002 $\mu$ l/ml)

Indomethacin = Cyclooxygenase-Inhibitor, gelöst in 100 µl DMSO

MK 886 = 5-Lipoxygenase-Inhibitor, gelöst in 100 µl DMSO

Die Toxine und Inhibitoren wurden nach Wirkung dosiert und entsprechen den Angaben von Sibelius et al. (90, 144).

#### **4.2.4 ECH- Test**

Für jede Charge ECH wurde zunächst die hämolytische Aktivität überprüft. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe des in Guanidinpuffer gelösten ECH von 1/10 bis 1/ 10000 in Zweierschritten erstellt. 50 µl einer 10%igen Kaninchenerythrozytensuspension und 50 µl jeder Verdünnungsstufe wurden eine Stunde lang in einem 37°C warmen Wasserbad unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und 10 µl des Überstandes abgenommen. Dieser wurde auf eine Mikrotiterplatte mit 90 µl physiologischer Kochsalzlösung zusammen pipettiert. Im Photometer erfolgte die Messung der Extinktion bei 405 nm. In halb-logarithmischer Darstellung der Extinktion gegen die Verdünnungsstufen konnte der 60%ige Wert der vollen Hämolyse mit zugehöriger Verdünnungsstufe (Titer) abgelesen werden.

#### **4.2.5 Limulus Test**

Der Limulus Amöbozyt Lysat (LAL) Test dient der Quantifizierung von Lipopolysacchariden (LPS). Eine auf den Gehalt an LPS zu untersuchende Lösung wird mit LAL versetzt. Dieses enthält ein Proenzym, dessen Aktivierung zum Enzym durch LPS katalysiert wird. Die Bildung des Enzyms ist direkt proportional zur LPS-Konzentration. Das aktivierte Enzym wiederum katalysiert die Abspaltung von farbigem p-Nitroanilin von einem zugeführten farblosen Substrat (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-p-Nitroanilin). Die Freisetzung des p-Nitroanilins kann in dem Bereich 405-410 nm als Absorption photometrisch bestimmt werden und korreliert linear zur Ausgangs-LPS-Konzentration. Im Vergleich zu Standards kann diese LPS-Menge absolut errechnet werden. Der Test wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um eine Verunreinigung des toxinhaltigen Perfusats mit LPS auszuschließen. Die Untersuchung ergab keinen meßbaren Gehalt an LPS. Der verwendete Test ist für den Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1ng LPS/ml geeignet.

#### 4.2.6 Auswertung und Statistik

Sämtliche Daten sind als Mittelwert +/- SEM aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Zur statistischen Signifikanzbewertung wurde der Tukey's Honestly Significant Difference Test sowie eine Varianzanalyse (one-way-ANOVA) eingesetzt. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. In den Grafiken wurden signifikant abweichende Werte mit \* oder # gekennzeichnet. Änderungen der Kontraktilität (LVDP,  $dp/dt_{max}$ ) und des RMF sind als relative, d.h. prozentuale Abweichungen von den Ausgangswerten dargestellt. CPP und CPF wurden als Abweichung vom Ausgangswert ( $\Delta CPP$  und  $\Delta CPF$ ) dargestellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Überblick

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht der Vergleich der Wirkungen von *Escherichia coli* Hämolysin und  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus* auf die Mikrozirkulation isoliert und zellfrei perfundierter Rattenherzen. Es wurde der Einfluß beider Toxine auf Parameter der coronaren Vasomotorik und myokardialen Kontraktilität untersucht. Parallel dazu wurde der regionale myokardiale Perfusionsfluß (RMF) mit Hilfe gefärbter Mikrosphären in fünf definierten Myokardarealen des Rattenherzens ermittelt. Von besonderem Interesse war dabei die freie Wand des linken Ventrikels. Hier zeigten sich toxinabhängige Perfusionsstörungen, die sich bei den beiden verwendeten Toxinen unterschieden. Verglichen wurden die Vorgänge bei flußkonstantem und druckkonstantem Perfusionsverfahren. Durch Pharmaka wurde versucht, die Auswirkung der eingesetzten bakteriellen Toxine auf Kontraktilität und Zirkulation zu inhibieren.

Bei den im Versuchsverlauf kontinuierlich aufgezeichneten physiologischen Parametern sind jeweils nur die drei Zeitpunkte dargestellt, zu denen die RMF-Bestimmung erfolgte. Alle toxininduzierten physiologischen Veränderungen ereigneten sich innerhalb eines Zeitraums von 30 Minuten. Aufgrund interindividueller Unterschiede wurden zur besseren Übersicht alle Veränderungen relativ zum Ausgangswert betrachtet. Neben coronarem Perfusionsdruck (CPP) und coronarem Perfusatfluß (CPF), die als  $\Delta$ CPP und  $\Delta$ CPF dargestellt sind, sind alle übrigen Parameter als prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (=100%) aufgezeigt. Die absoluten Werte dieser Parameter im „steady-state“, also vor Toxinapplikation, sind den Tabellen 1-4 zu entnehmen.

Parameter	CPP (mmHg)	CPF (ml/min)	LVDP (mmHg)	dP/dtmax (mmHg/s)
druckkonstant	75*	18.4 (0.9)	99.0 (2.9)	4130 (177)
flußkonstant	54.4 (1.9)	10.9 (0.3)*	76.7 (2.2)	3340 (142)

**Tab. 1:** Kontraktionsparameter und coronare Vasomotorik während des „steady-states“. Mittelwerte (SEM) aller Versuche zum Zeitpunkt -10 vor Toxinapplikation.\* = durch Versuchsaufbau vorgegeben. Druckkonstante Gruppe n=24, flußkonstante n=23.

RMF(ml/min/g)	ENDO	EPI	SEPT	RV	REST	E/E
druckkonstant	32.5 (2.8)	29.0 (3.1)	21.1 (1.9)	19.4 (2.0)	13.5 (0.9)	1.3 (0.1)
flußkonstant	17.9 (1.9)	15.4 (1.7)	16.7 (1.3)	20.6 (2.0)	9.7 (0.7)	1.2 (0.1)

**Tab. 2:** Regionale myokardiale Perfusion während des „steady-states“ in ml/min/g. Mittelwerte (SEM) aller Versuche zum Zeitpunkt -10 vor Toxinapplikation. Druckkonstante Gruppe n=24, flußkonstante n=22.

## 5.2 Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von ECH

### 5.2.1 Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion

In den Kontrollversuchen ohne Zusatz von Toxin oder Pharmaka zeigte sich während der Versuchsdauer lediglich ein leichter Abfall des coronaren Perfusionsflusses (CPF) als reziprokes Maß des coronaren Gefäßwiderstandes bei druckkonstanter Perfusion mit 75mmHg. Während des halbstündigen Beobachtungszeitraumes fiel der CPF um 1,5 ml/min vom Ausgangswert ab. Die coronare Einschwemmung von ECH (0,25 HU/ml) führte zu einem dramatischen Abfall des CPF um -9,2 ml/min. In Gegenwart des Lipoxigenaseinhibitors MK886 (7,5 µM) war der ECH-induzierte Abfall des CPF deutlich vermindert (Abb.13a).

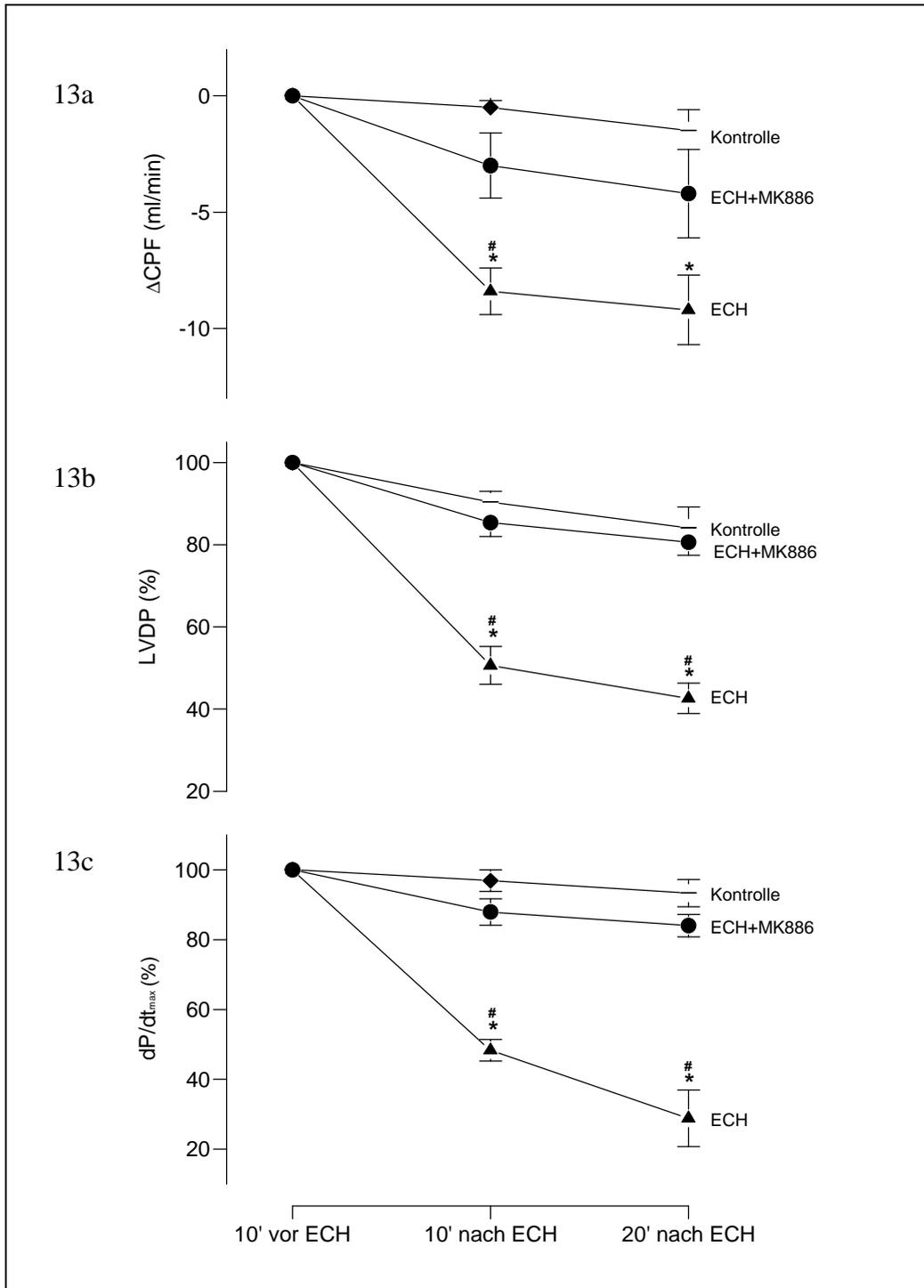
Parallel zum toxinabhängigen Rückgang des Perfusionsflusses trat auch ein Einbruch der

Kontraktilität der ECH-perfundierten Herzen ein. Die Kontraktilität der Herzen wurde zum einen durch den systolisch entwickelten linksventrikulären Druck (left ventricular developed pressure, LVDP) erfaßt, der die Differenz zwischen enddiastolischem und endsystolischem Druck wiedergibt. Zum anderen wurde als zweiter Kontraktilitätsparameter die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) registriert. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein leichter Abfall der Kontraktilität im betrachteten Zeitraum. Der LVDP fiel auf 84,1%,  $dP/dt_{max}$  auf 93,3% des Ausgangswertes ab. Die mit ECH perfundierten Herzen wiesen dagegen einen massiven Abfall des LVDP auf 42,6% und des  $dP/dt_{max}$  auf 28,8% auf. Durch Applikation von MK886 konnte der toxininduzierte Kontraktilitätsverlust nahezu vollständig verhindert werden. Unter Einfluß dieses Inhibitors sank der LVDP auf 80,6% und die  $dP/dt_{max}$  lediglich auf 84% des Ausgangswertes (Abb.13b, c). Im Unterschied zu den  $\alpha$ -Toxin-Versuchen stieg in denen mit ECH der enddiastolische Druck ( $LVP_{dia}$ ) auf Werte zwischen 30 und 40 mmHg. Auch dieser Effekt konnte mit MK886 vollständig unterbunden werden (Daten sind nicht graphisch dargestellt).

### 5.2.2 Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion

Die ECH-induzierten Veränderungen im flußkonstanten Versuchsaufbau entsprachen größtenteils denen bei druckkonstanter Perfusion. In diesem Verfahren wurde jedoch nicht der CPF, sondern der coronare Perfusionsdruck (coronary perfusion pressure, CPP) als Maß des coronaren Gefäßwiderstandes erfaßt. Nicht der Perfusionsdruck, sondern der Perfusatfluß wurde in diesem System vorgegeben (10-12 ml/min/g). In der Kontrollgruppe fand ein leichter Anstieg des CPP um 10,4 mmHg im Beobachtungszeitraum statt. Die Perfusion von ECH (0,25 HU/ml) verursachte dagegen einen Anstieg des CPP um 51,8 mmHg. Der Inhibitionsversuch mit MK 886 zeigte eine weitgehende Unterdrückung der ECH-Wirkung. Der Anstieg betrug hier +19,8 mmHg (Abb.14 a).

Der Effekt von ECH auf die kardiale Pumpfunktion resultierte in einer Abnahme von LVDP und  $dP/dt_{max}$ . Für den LVDP ergab sich eine Abnahme auf 71,2% des Ausgangswertes gegenüber der Kontrollgruppe, die mit 102,3% einen geringfügigen Anstieg verzeichnete.  $dP/dt_{max}$  sank auf 55,5% gegenüber dem Kontrollwert von 104,6%.



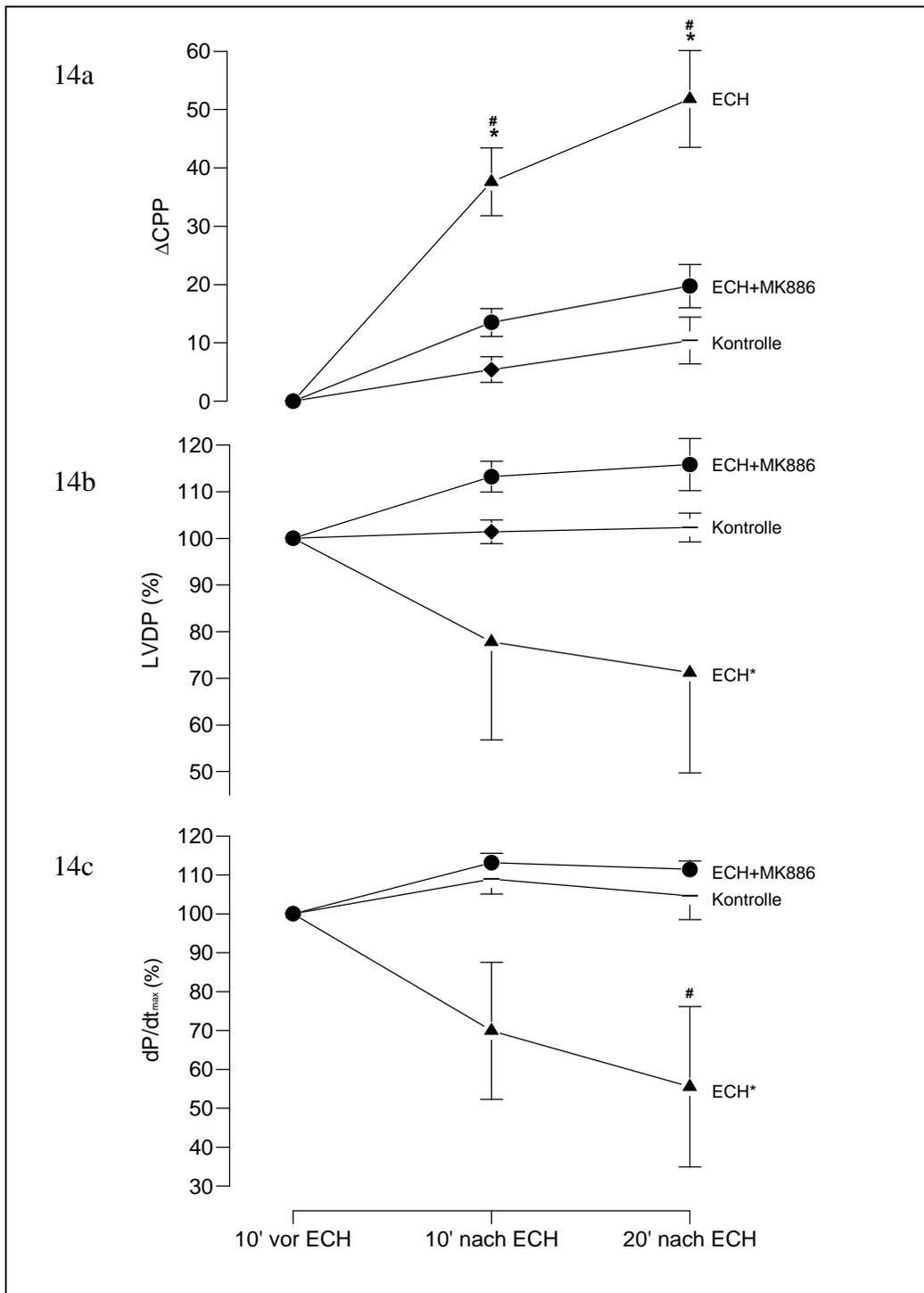
**Abb.13:** Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von ECH bei druckkonstanter Perfusion. Aufgetragen sind die Werte zu den drei Zeitpunkten der RMF-Messung.  $\blacklozenge$  = Kontrollgruppe (unbehandelt),  $\blacktriangle$  = ECH,  $\bullet$  = ECH+MK886. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der Inhibitoren-Gruppe. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich gingen in dieser ECH-Gruppe von n=5 vier Herzen in Kammerflimmern über, und zwar eins vor dem zweiten Zeitpunkt der RMF-Messung (10 min nach ECH-Exposition), eins vor dem dritten Zeitpunkt der RMF-Messung (20 min nach ECH-Exposition) und zwei Herzen nach dem dritten Meßzeitpunkt, d.h. außerhalb des in Abb.14 dargestellten Zeitraumes. In der mit MK886 und ECH perfundierten Gruppe trat hingegen in keinem Fall Kammerflimmern auf. Die Werte für LVDP und  $dp/dt_{max}$  lagen mit 115,8% bzw. 111,4% über Kontrollniveau (Abb.14 b, c).

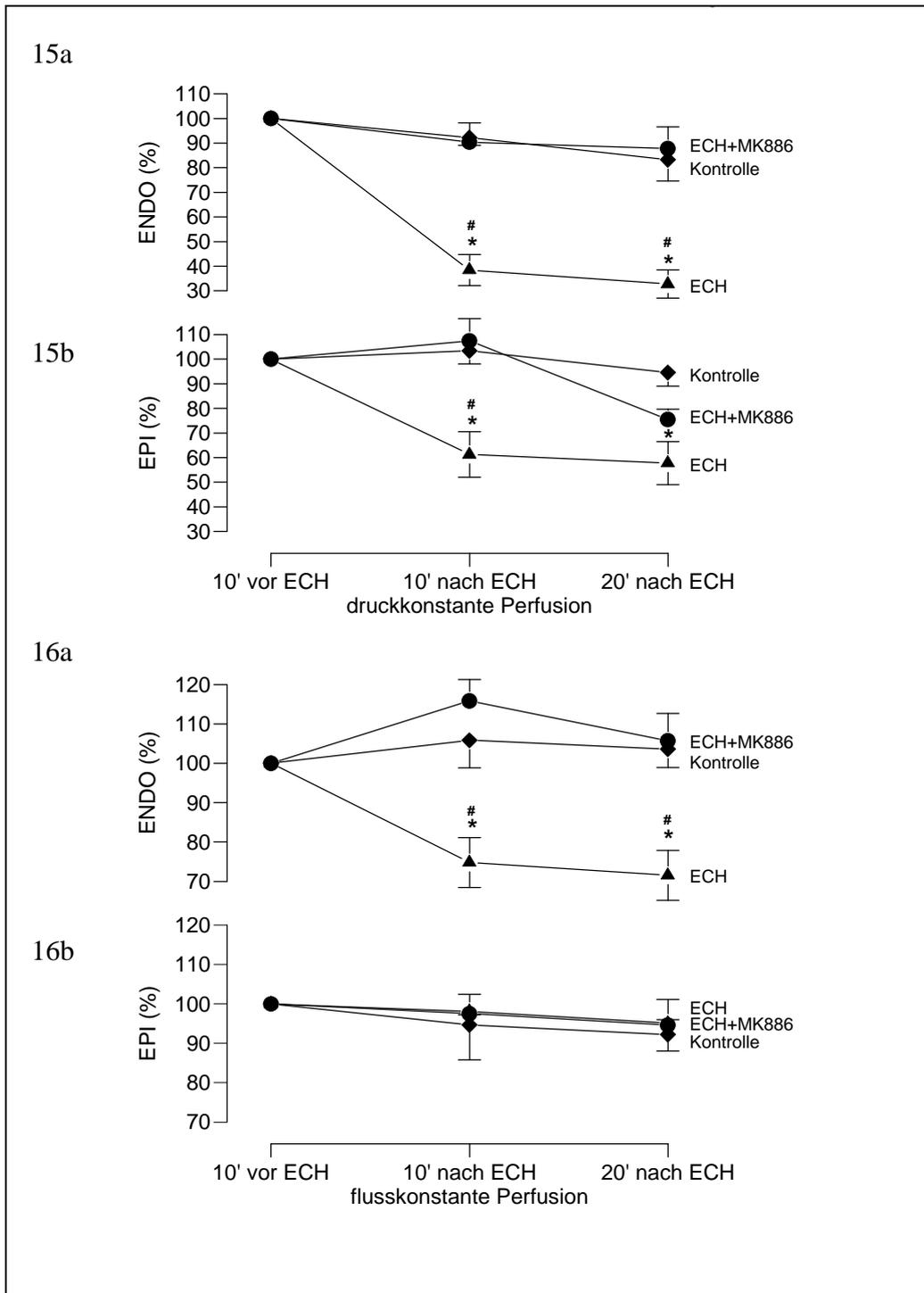
## **5.3 Veränderungen der regionalen myokardialen Perfusion durch ECH**

### **5.3.1 Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion**

Der regionale myokardiale Perfusionsfluß (regional myocardial flow, RMF) wurde in fünf anatomischen Anteilen des Rattenherzens bestimmt. Sie bestanden aus dem endokardialen (ENDO) und epikardialen Anteil (EPI) der freien Wand des linken Ventrikels, dem Septum (SEPT), der freien Wand des rechten Ventrikels (RV) sowie einem aus Herzbasis und Apex bestehender Rest (REST). Im betrachteten Zeitraum zeigte sich für ENDO in der Kontrollgruppe ein leichter Abfall des RMF auf 83,2% des Ausgangswertes. Durch die coronare Perfusion von ECH (0,25 HU/ml) verminderte sich der RMF dieses Myokardanteils drastisch auf 32,8%, wohingegen in Anwesenheit des Lipoxygenaseinhibitors MK886 die endokardiale Perfusion trotz ECH-Gabe ungefähr auf Kontrollniveau verblieb (87,8%). Die Veränderung der regionalen Perfusion war im epikardialen Anteil weitaus geringer ausgeprägt. Die Kontrolle sank auf 94,5%. Die ECH-Gruppe verzeichnete mit einer Abnahme auf 57,7% einen deutlich geringeren Rückgang der regionalen Perfusion als die endokardialen Gewebsabschnitte. Durch die gleichzeitige Perfusion von MK886 ließ sich der Rückgang der epikardialen Perfusion deutlich vermindern. Diese Ergebnisse sind in Abb.15 dargestellt. Der RMF in SEPT sank unter Toxineinwirkung auf 57,9% im Vergleich zur Kontrolle mit 92,2%. Auch im REST war eine Verminderung des RMF durch ECH erkennbar. Die Perfusion sank auf 54,5% des Ausgangswertes gegenüber dem Kontrollwert von 89,8%. Die regionalen myokardialen Perfusionen dieser drei Myokardanteile sind nicht graphisch dargestellt, sondern in den Tabellen 3 und 4 wiederzufinden.



**Abb.14:** Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von ECH bei flußkonstanter Perfusion. Aufgetragen sind die Werte zu den drei Zeitpunkten der RMF-Messung. ◊ = Kontrollgruppe (unbehandelt), ▲ = ECH, ● = ECH+MK886. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der Inhibitoren-Gruppe. ECH\* = von n=5 gingen 4 Herzen in Kammerflimmern über. Die Mittelwerte +/- SEM stammen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.



**Abb.15, 16:** Regionale myokardiale Perfusion in der linken Ventrikelwand unter ECH. *Abb.15:* Bei druckkonstanter Perfusion. 15a = endokardiale Gewebsabschnitte, 15b = epikardiale Gewebsabschnitte. *Abb.16:* Bei flusskonstanter Perfusion. 16a = endokardiale Gewebsabschnitte, 16b = epikardiale Gewebsabschnitte. ○ = Kontrollgruppe (unbehandelt), △ = ECH, ● = ECH+MK886. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der Inhibitoren-Gruppe. Die Mittelwerte +/- SEM stammen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

### **5.3.2 Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion**

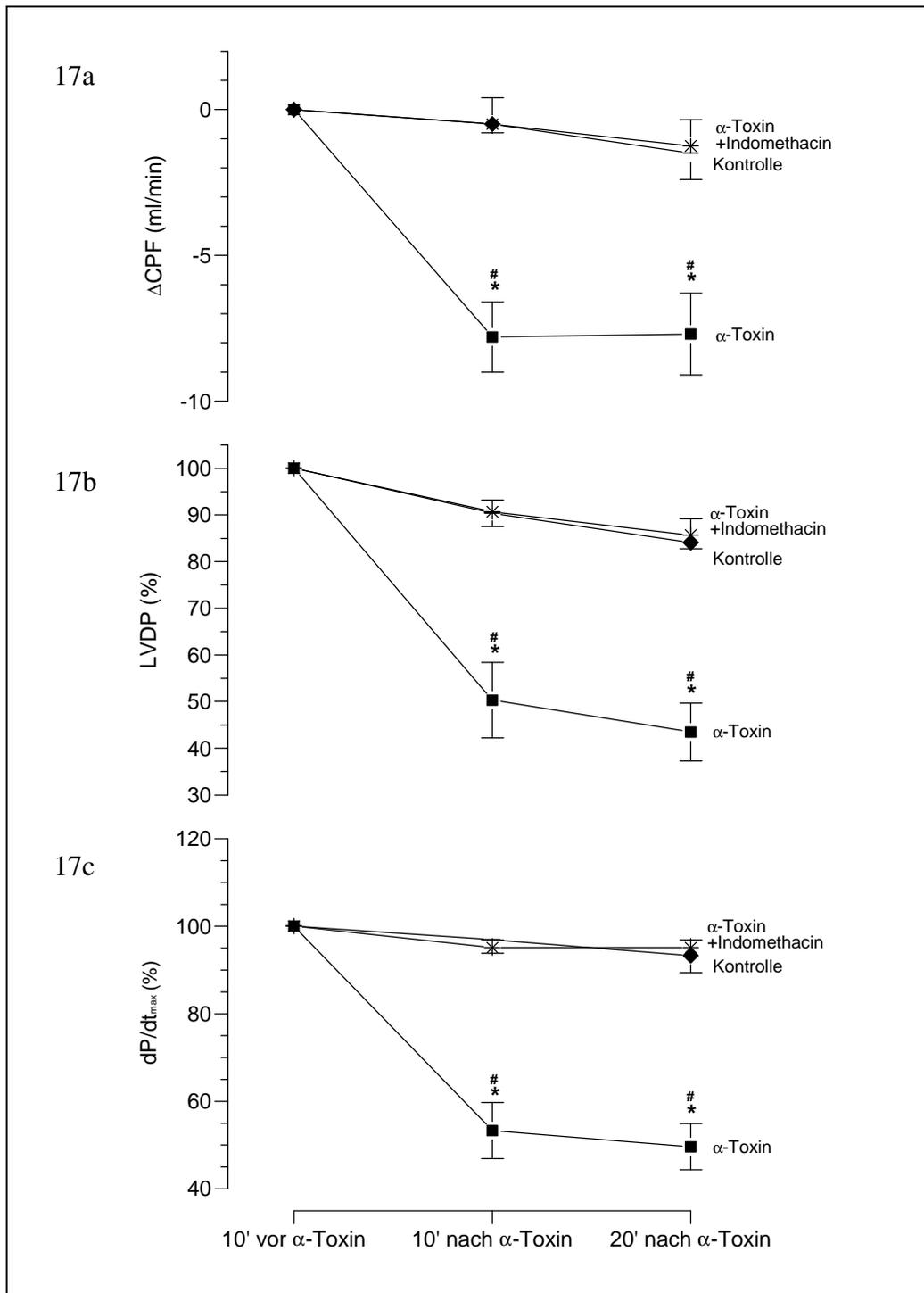
Bei flußkonstanter Perfusion der Rattenherzen führte die Gabe von ECH in den endokardialen Gewebsabschnitten zu gleichsinnigen Veränderungen wie im druckkonstanten System. Während der RMF der Kontrolle konstant blieb (103,6% nach 20 min), sank er in Anwesenheit von ECH auf 71,5%. Dieser Toxineinfluß war durch MK 886 antagonisierbar. In den epikardialen Gewebeabschnitten hingegen lagen alle drei Gruppen im gleichen RMF-Bereich zwischen 92% und 100% des Ausgangswertes (Abb.16). In den übrigen Myokardanteilen lagen nur wenige signifikante Unterschiede vor (graphisch nicht dargestellt, Tabelle 3 und 4).

## **5.4 Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von $\alpha$ -Toxin**

### **5.4.1 Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion**

Innerhalb eines halbstündigen Zeitraumes fiel der CPF der Kontrollgruppe, wie schon in 5.2.1. erwähnt, um 1,5 ml/min vom Ausgangswert ab. Der Zusatz von  $\alpha$ -Toxin in einer Endkonzentration von 1 $\mu$ g/ml zum Perfusat bewirkte dagegen eine Änderung von  $\Delta$ CPF von -7,7 ml/min. Bei Zusatz des Cyclooxygenaseinhibitors Indomethacin in einer Endkonzentration von 250  $\mu$ M im Perfusat konnte das applizierte  $\alpha$ -Toxin in obenstehender Konzentration lediglich einen Abfall des CPF um 1,25 ml bewirken.

Parallel zur Minderung des Perfusionsflusses trat auch ein Kontraktilitätsverlust bei den mit  $\alpha$ -Toxin perfundierten Herzen ein. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein leichter Abfall beider Kontraktilitätsparameter im betrachteten Zeitraum. Der LVDP fiel hier auf 84,1%,  $dP/dt_{max}$  auf 93,3% des Ausgangswertes ab. Die mit  $\alpha$ -Toxin perfundierten Herzen wiesen dagegen einen massiven Abfall des LVDP auf 43,5% und des  $dP/dt_{max}$  auf 49,6% auf. Durch Indomethacin konnten die Kontraktilitätsparameter vollständig auf Kontrollniveau gehalten werden. Unter Einfluß dieses Inhibitors sank der LVDP auf 85,7% und  $dP/dt_{max}$  lediglich auf 95,1% des Ausgangswertes. Dargestellt sind diese Ergebnisse in Abb.17.



**Abb.17:** Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von  $\alpha$ -Toxin bei druckkonstanter Perfusion. Aufgetragen sind die Werte zu den drei Zeitpunkten der RMF-Messung. ○ = Kontrollgruppe (unbehandelt), ■ =  $\alpha$ -Toxin, × =  $\alpha$ -Toxin+Indomethacin. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der Inhibitoren-Gruppe. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

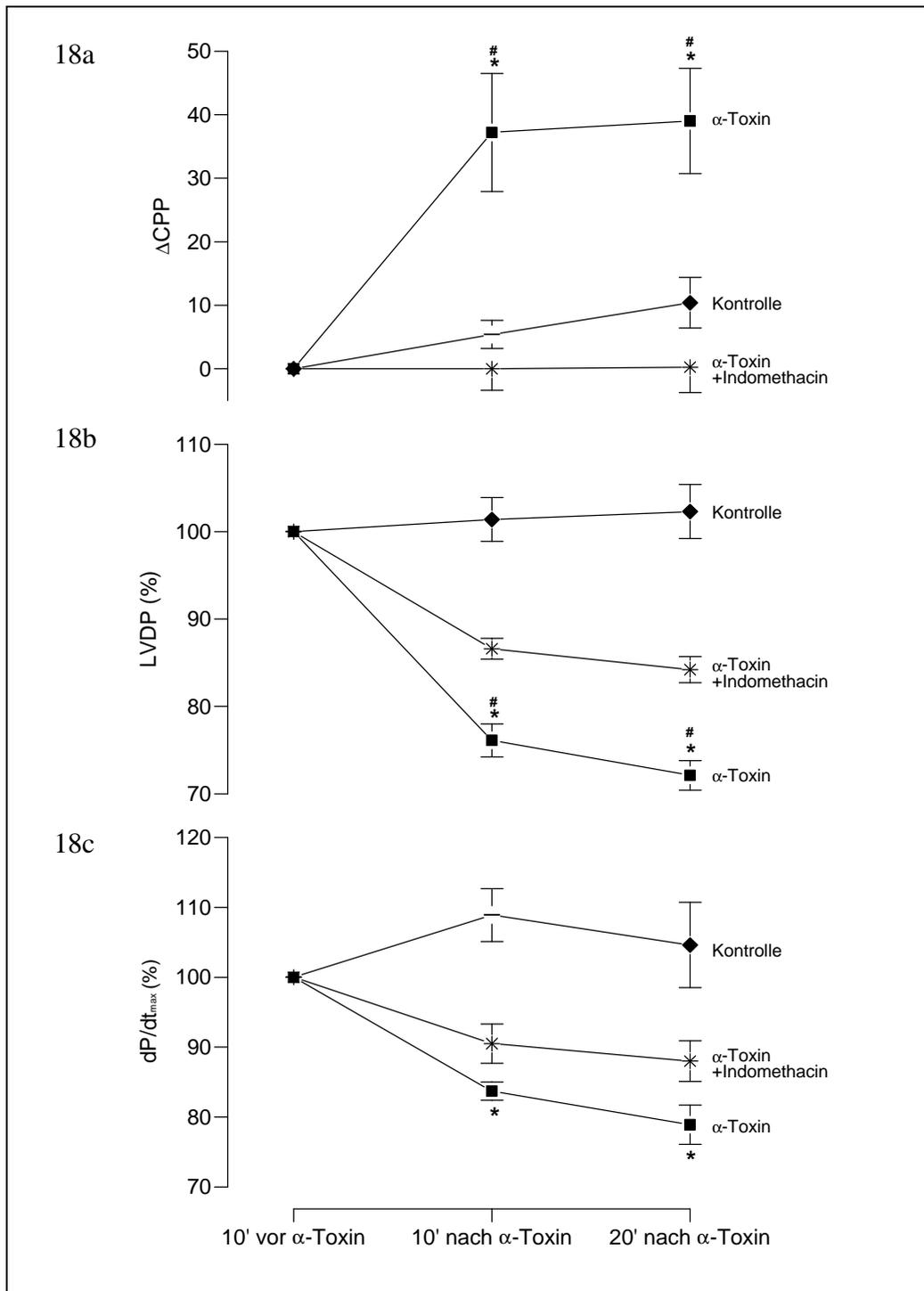
## 5.4.2 Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion

In der Kontrollgruppe fand ein leichter Anstieg des CPP im betrachteten Zeitraum um 10,4 mmHg statt. Die coronare Perfusion von  $\alpha$ -Toxin (1 $\mu$ g/ml) verursachte dagegen einen Anstieg des CPP um 39 mmHg. In Anwesenheit des Cyclooxygenaseinhibitors Indomethacin (250 $\mu$ M) war der  $\alpha$ -Toxin-induzierte Anstieg komplett aufgehoben (Abb. 18a). Der Effekt von  $\alpha$ -Toxin auf die kardiale Pumpfunktion resultierte in einer Abnahme von LVDP und  $dP/dt_{max}$ . Für den LVDP ergab sich eine Abnahme auf 72,1% nach 20 min (Kontrollgruppe 102,3% nach 20 min) und für  $dP/dt_{max}$  ein Rückgang auf 78,9% (Kontrollwert 104,6%). Dieser toxinbedingte Kontraktilitätsverlust war in Anwesenheit des Cyclooxygenaseinhibitors deutlich abgeschwächt. Die mit Indomethacin und  $\alpha$ -Toxin perfundierte Gruppe ergab für LVDP lediglich einen Rückgang auf 84,2% und für  $dP/dt_{max}$  auf 88% des Ausgangswertes (Abb. 18b, c).

## 5.5 Veränderungen der regionalen myokardialen Perfusion durch $\alpha$ -Toxin

### 5.5.1 Ergebnisse der druckkonstanten Perfusion

Im betrachteten Zeitraum kam es in den endokardialen Myokardschichten der Kontrollgruppe zu einem leichten Abfall des RMF auf 83,2% des Ausgangswertes. Unter Einfluß von 1 $\mu$ g  $\alpha$ -Toxin/ml Perfusat verminderte sich der RMF dieses Myokardanteils auf 51,1% innerhalb von 20 Minuten. In Anwesenheit von Indomethacin blieb die endokardiale Perfusion trotz  $\alpha$ -Toxin-Gabe vollständig erhalten. Auch im epikardialen Anteil des linken Ventrikels kam es durch Perfusion von  $\alpha$ -Toxin zu einem Einbruch des RMF. Während die Kontrolle innerhalb von 20 min auf 94,5% sank, kam es in der  $\alpha$ -Toxin-Gruppe zu einer Abnahme auf 43,8% des Ausgangswertes. Die mit Indomethacin inhibierte Gruppe zeigte in EPI zum zweiten Meßzeitpunkt immerhin noch eine Perfusion von 83,3% vom Ausgangswert (Abb.19). Der RMF in SEPT sank unter Toxineinwirkung auf 48% im Vergleich zur Kontrolle mit 92,2% und zur Indomethacin-Gruppe mit 116,8%. Auch im REST war eine Verminderung des RMF durch  $\alpha$ -Toxin erkennbar. Die Perfusion sank auf 55,3% des Ausgangswertes gegenüber dem Kontrollwert von 89,8% und dem Wert 91,3% in der Indomethacin-Gruppe. In RV war keine signifikante Änderungen des RMF festzustellen. Die regionalen myokardialen Perfusionen der letzten drei Myokardanteile sind in Tabelle 3 und 4 wiedergegeben.



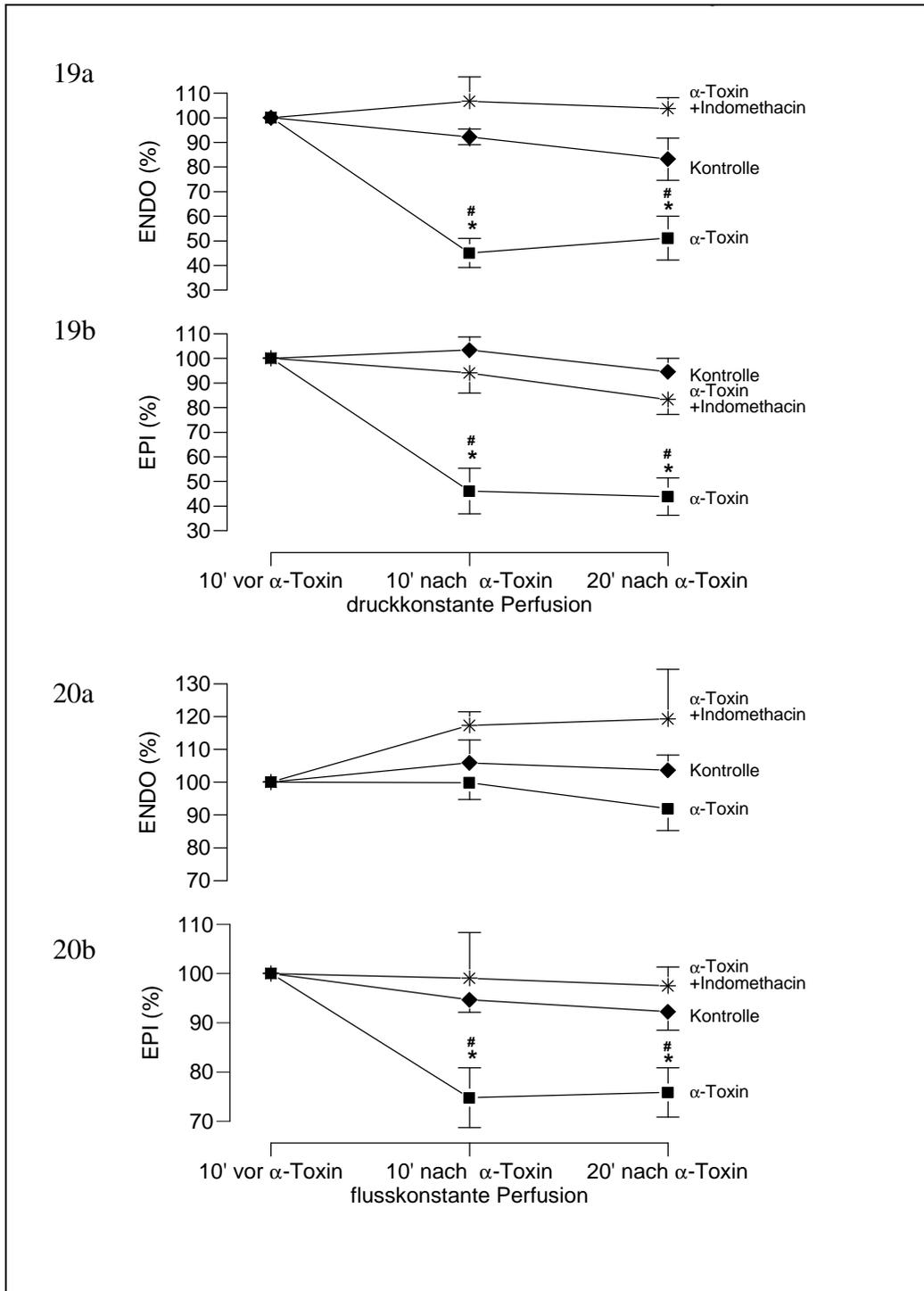
**Abb.18:** Veränderungen der Kontraktilität und coronaren Vasomotorik unter Einfluß von  $\alpha$ -Toxin bei flußkonstanter Perfusion. Aufgetragen sind die Werte zu den drei Zeitpunkten der RMF-Messung. ◆ = Kontrollgruppe (unbehandelt), ■ =  $\alpha$ -Toxin, \* =  $\alpha$ -Toxin+Indomethacin. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der Inhibitoren-Gruppe. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

### **5.5.2 Ergebnisse der flußkonstanten Perfusion**

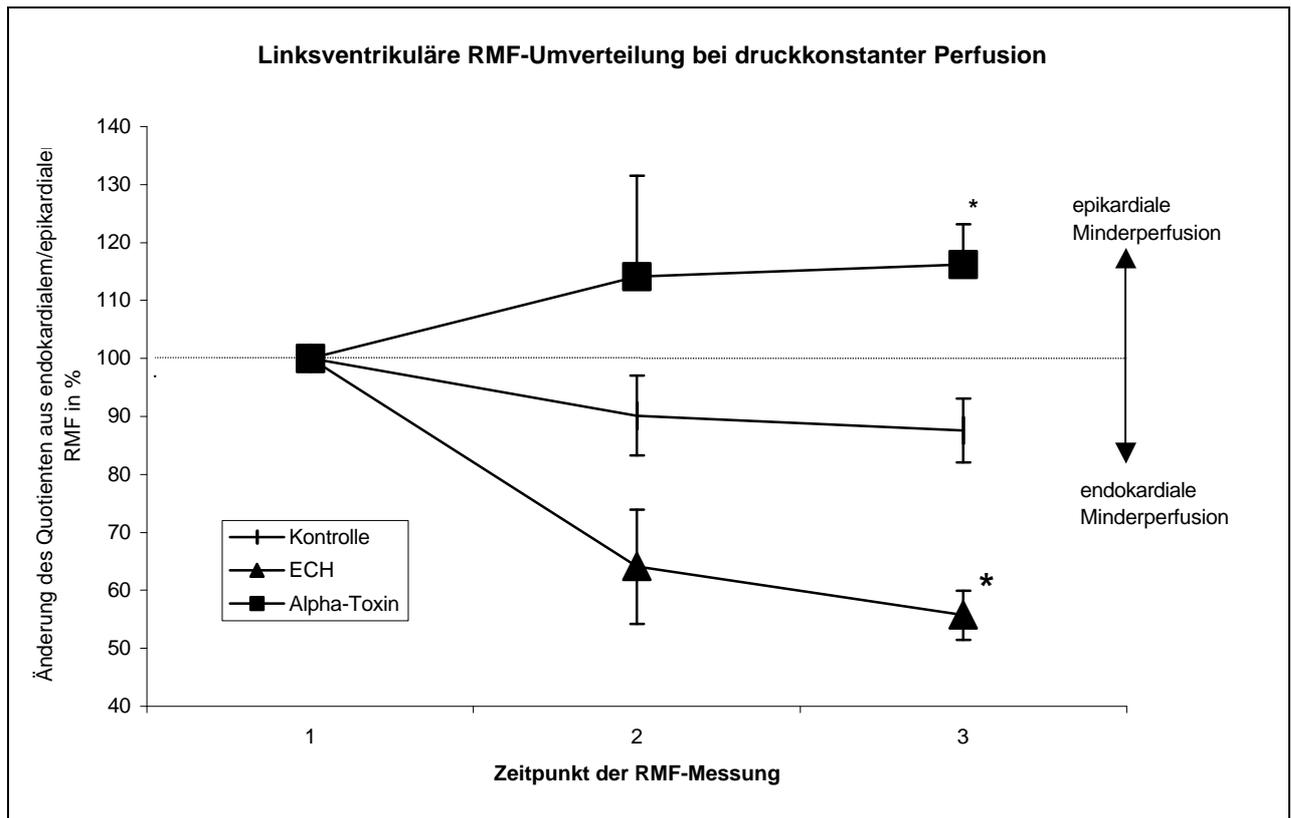
$\alpha$ -Toxin führte im flußkonstanten Versuchsaufbau zu einem tendenziellen, aber nicht signifikanten Rückgang der endokardialen Perfusion. Der RMF im epikardialen Anteil des linken Ventrikels zeigte unter  $\alpha$ -Toxin jedoch einen deutlichen Abfall auf 75,8% des Ausgangswertes. Er unterschied sich damit signifikant von der Kontrolle mit einem Wert von 92,2% und der Indomethacin-Gruppe mit 97,5% (Abb.20). Der RMF in REST stieg unter Toxineinwirkung auf 123,7% zum zweiten Zeitpunkt und unterschied sich damit lediglich von der Indomethacin-Gruppe mit 92,7% des Ausgangswertes. Daneben wiesen SEPT, RV und REST keine signifikanten Abweichungen im RMF auf. Die regionalen myokardialen Perfusionen dieser Myokardanteile sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

### **5.6 Vergleichende Betrachtung der Auswirkungen beider Toxine auf die regionale myokardiale Perfusion in der linken Ventrikelwand**

Um die Verteilung der regionalen myokardialen Perfusion der freien Wand des linken Ventrikels zwischen endokardialen und epikardialen Gewebsabschnitten genauer erfassen zu können, wurde aus den absoluten regionalen Perfusatflssen der Quotient ENDO/EPI gebildet. Wie aus Tab.2 ersichtlich wird, sind bei einem Quotienten von 1,25 +/- 0,1 bzw. 1,20 +/- 0,1 sowohl im druck- als auch im flußkonstanten Versuchsaufbau die endokardialen Myokardabschnitte besser perfundiert als die epikardialen. Auch der Quotient wurde aufgrund interindividueller Unterschiede als prozentualer Anteil vom Ausgangswert bestimmt. Abb.21 und 22 zeigen, wie der Quotient sich im Verlauf des betrachteten Zeitraumes änderte. Es sind die Quotienten der Kontrollgruppe, der ECH- und der  $\alpha$ -Toxin-Gruppe jeweils druck- und flußkonstant dargestellt. Eine Abweichung der Graphen von der 100%-Marke verdeutlicht eine Umverteilung der Perfusion zwischen den Myokardschichten im Vergleich zum Ausgangswert. Der deutliche Rückgang des Quotienten bei druckkonstanter Perfusion zeigt einen überproportionalen Rückgang der endokardialen im Vergleich zur epikardialen regionalen Perfusion durch die coronare Einschwemmung von ECH an, wogegen mit  $\alpha$ -Toxin perfundierte Herzen eine überproportional verminderte Perfusion im epikardialen Myokard aufweisen. Der Quotient fiel bei der ECH-Gruppe auf 55,7%, stieg aber bei der  $\alpha$ -Toxin-Gruppe auf 116,2%. Die Kontrolle fiel leicht auf 87,6%. Bei flußkonstanter Perfusion fanden sich gleichsinnige Veränderungen. Während die Kontrollgruppe auf 113,7% anstieg, fiel die ECH-Gruppe auf 75,4%. Die  $\alpha$ -Toxin-Gruppe stieg auf 123,2%.



**Abb.19, 20:** Regionale myokardiale Perfusion in der linken Ventrikelwand unter  $\alpha$ -Toxin. *Abb.19:* Bei druckkonstanter Perfusion. 19a = endokardiale Gewebsabschnitte, 19b = epikardiale Gewebsabschnitte. *Abb.20:* Bei fluskonstanter Perfusion. 20a = endokardiale Gewebsabschnitte, 20b = epikardiale Gewebsabschnitte.  $\diamond$  = Kontrollgruppe (unbehandelt),  $\blacksquare$  =  $\alpha$ -Toxin,  $\ast$  =  $\alpha$ -Toxin+Indomethacin. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der Inhibitoren-Gruppe. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

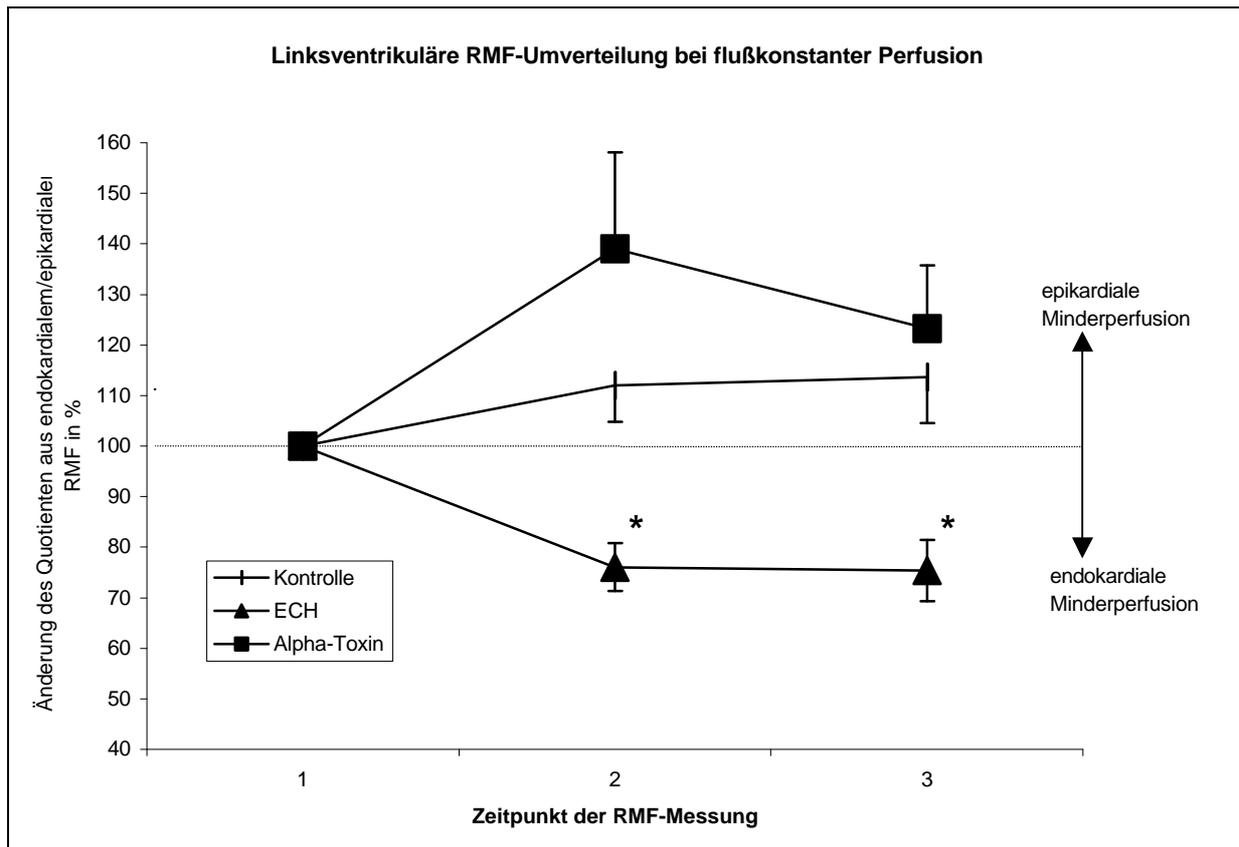


**Abb.21:** Prozentuale Abweichung des Quotienten aus endokardialer/epikardialer Perfusion vom Ausgangswert bei druckkonstanter Perfusion. Zum dritten Meßzeitpunkt unterscheiden sich die beiden Toxingruppen signifikant von der Kontrollgruppe und voneinander (\*). Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Somit unterschieden sich die Umverteilungen der regionalen linksventrikulären Perfusion durch die Exotoxine ECH und  $\alpha$ -Toxin in beiden Versuchsanordnungen signifikant voneinander.

## 5.7 Ergebnisse der Kontrollversuche

Um Effekte durch MK886, Indomethacin oder das eingesetzte Lösungsmittel DMSO auszuschließen, wurden weitere Kontrollexperimente mit diesen Stoffen in gleicher Dosierung vorgenommen, wie in den übrigen Versuchen. Ihre Auswirkungen auf CPP, CPF, LVDP,  $dP/dt_{max}$  und RMF wurden mit mindestens drei unabhängigen Versuchen überprüft. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollgruppen mit unbehandelten Herzen, so daß in allen graphischen Darstellungen die gleiche Kontrollgruppe mit unbehandelten Rattenherzen zum Vergleich dienen konnte. Die Ergebnisse der hier genannten weiterführenden Kontrollexperimente sind nicht graphisch dargestellt.



**Abb.22:** Prozentuale Abweichung des Quotienten aus endokardialer/epikardialer Perfusion vom Ausgangswert bei flußkonstanter Perfusion. Zum zweiten und dritten Meßzeitpunkt unterscheidet sich die ECH-Gruppe signifikant von der  $\alpha$ -Toxin-Gruppe und der Kontrolle (\*). Die Mittelwerte  $\pm$  SEM stammen aus mindestens 4 unabhangigen Experimenten.

## 5.8 **Ödembildung**

Sowohl durch  $\alpha$ -Toxin, als auch durch ECH konnte am Versuchende eine Gewichtszunahme des gesamten Rattenherzens zwischen 10 und 20% festgestellt werden. Diese Gewichtszunahme konnte nicht durch pharmakologische Intervention verhindert werden und zeigte sich nicht in Kontrollherzen.

Probe	min	Kontrolle	ECH	ECH+ MK886	$\alpha$ -Toxin	$\alpha$ -Toxin+Indo
ENDO	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.00)	100.0 (0.0)
	10	92.2 (3.2)	38.4 (6.3)* #	90.4 (7.8)	45.0 (5.9)* #	106.7 (9.8)
	20	83.2 (8.5)	32.8 (5.7)* #	87.8 (8.8)	51.1 (8.9)* #	103.7 (4.5)
EPI	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.00)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	103.4 (5.4)	61.2 (9.3)* #	107.4 (9.0)	46.0 (9.3)* #	94.1 (8.2)
	20	94.5 (5.5)	57.7 (8.8)*	75.4 (4.2)	43.8 (7.6)* #	83.3 (6.1)
SEPT	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	100.7 (8.2)	63.6 (9.1)*	77.0 (9.0)	44.6 (6.9)* #	114.0 (10.6)
	20	92.2 (8.7)	57.9 (10.6)	91.0 (20.5)	48.0 (7.3)* #	116.8 (16.3)
RV	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	97.2 (3.9)	92.2 (19.5)	63.6 (12.1)	85.9 (17.2)	78.5 (13.7)
	20	101.3 (7.3)	80.0 (19.6)	83.0 (21.1)	86.4 (15.2)	76.2 (11.2)
REST	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	93.8 (6.0)	53.8 (6.5)*	72.5 (8.1)	56.6 (12.4)	87.1 (3.3)
	20	89.8 (5.0)	54.5 (7.6)*	76.4 (10.7)	55.3 (7.5)* #	91.3 (4.8)

**Tab. 3:** Regionaler myokardialer Fluß in % (SEM) der einzelnen Gewebsabschnitte im druckkonstanten Perfusionsverfahren. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der zugehörigen Inhibitionsgruppe (ECH:MK886,  $\alpha$ -Toxin:Indomethacin).

Probe	min	Kontrolle	ECH	ECH+ MK	$\alpha$ -Toxin	$\alpha$ -Toxin+Indo
ENDO	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	105.8 (7.0)	74.8 (6.4)* #	115.8 (5.4)	99.8 (5.1)	117.3 (4.2)
	20	103.6 (4.7)	71.5 (6.3)* #	105.7 (7.0)	91.9 (6.7)	119.3 (15.1)
EPI	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	94.7 (2.6)	98.1 (4.3)	97.5 (11.8)	74.7 (6.1)* #	99.0 (9.3)
	20	92.2 (3.8)	95.1 (6.0)	94.6 (6.6)	75.8 (5.0)* #	97.5 (3.8)
SEPT	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	96.1 (4.0)	88.1 (5.5)#	120.5 (8.0)*	108.4 (6.1)	98.0 (3.9)
	20	101.9 (4.9)	78.8 (21.8)	107.4 (4.3)	98.0 (8.3)	101.8 (9.6)
RV	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	85.8 (16.4)	115.0 (14.4)	85.7 (4.1)	97.8 (10.1)	75.8 (11.6)
	20	110.0 (4.9)	103.7 (13.9)	86.1 (8.2)	129.2 (22.5)	95.1 (29.2)
REST	-10	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)
	10	106.9 (4.7)	115.0 (7.9)	97.0 (2.8)	123.7 (6.9)#	92.7 (4.5)
	20	99.3 (4.3)	129.2 (9.7)*	104.5 (6.4)	120.3 (5.3)	98.2 (8.1)

**Tab. 4:** Regionaler myokardialer Fluß in % (SEM) der einzelnen Gewebsabschnitte im flußkonstanten Perfusionsverfahren. \* unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe, # unterscheidet sich signifikant von der zugehörigen Inhibitionsgruppe (ECH:MK886,  $\alpha$ -Toxin:Indomethacin).

## **6 Diskussion**

### **6.1 Herleitung der Fragestellung**

#### **6.1.1 Pathogenese des septischen Schocks und der septischen Kardiomyopathie**

Der septische Schock gilt nach wie vor als Herausforderung der klinischen Forschung, da bisher keine neuen Therapien die Überlebensrate dieses häufig mit letalem Ausgang verbundenen Krankheitsgeschehens deutlich verbessern konnten. Mittlerweile ist bekannt, daß eine in der Sepsis auftretende Herzinsuffizienz am therapierefraktären Schockgeschehen maßgeblich beteiligt sein kann. Diese mit Dilatation beider Ventrikel und verminderten Auswurfractionen einhergehende Pumpstörung wird als septische Kardiomyopathie bezeichnet. Das Herz vermag aufgrund dieser Erkrankung nicht, den durch die Sepsis massiv erniedrigten Blutdruck vollständig zu kompensieren. Die Ursachen der septischen Kardiomyopathie sind unzureichend geklärt. Zum einen scheinen Zytokine, deren Plasmaspiegel bei Sepsis erhöht sind, eine negativ inotrope Wirkung auf das Herz zu haben. Zum anderen könnten eine Vielzahl im Rahmen der Sepsis freigesetzte vasoaktive Mediatoren Mikrozirkulationsstörungen hervorrufen, welche wiederum in einer verminderten Myokardfunktion resultieren könnten. Solche Mikrozirkulationsstörungen sind in anderen Organen in der Sepsis schon genau charakterisiert worden (44-52). Über das Vorliegen solcher Perfusionsalterationen im Herz gibt es allerdings nur wenige Untersuchungen. Es gibt aber eindeutige Hinweise, daß trotz erhöhter coronarer Perfusion und ausreichendem O<sub>2</sub>-Angebot Perfusionsinhomogenitäten zur Schädigung des Myokards führen könnten (23, 43, 53, 54). Zum einen wurde als Ursache ein Nebeneinander über- und unterperfundierter Kapillarabschnitte auf mikrozirkulatorischer Ebene im Sinne eines funktionellen Shuntings vorgeschlagen, wie sie in der Sepsis in Lunge und Darm vorgefunden wurden (44-49). Aber auch Verteilungsstörungen zwischen verschiedenen Myokardarealen könnten durchaus zur Pathogenese dieser Organfunktionsstörung beitragen. Der Versorgung des linken Ventrikelmyokards scheint dabei eine besondere Rolle zuzukommen. Unter LPS zeigte der physiologischerweise heterogene Perfusionsfluß in dieser Myokardregion Verteilungsstörungen zwischen endokardial und epikardial gelegenen Schichten (53).

### **6.1.2 Bedeutung bakterieller porenbildender Exotoxine in der Sepsis**

Die meisten experimentellen Untersuchungen zur Sepsis und septischen Kardiomyopathie wurden entweder mit lebenden Bakterienstämmen oder mit Endotoxin vorgenommen. Viele Arbeitsgruppen bedienten sich in Ganztiermodellen der CLP-Methodik (cecal ligation and perforation), durch die eine durch unterschiedlichste Enterobacteriaceae verursachte Peritonitis induziert wurde. Als lebende Sepsiserreger wurden im Ganztier wie in isolierten Organen *Escherichia coli* und seltener *Staphylococcus aureus* eingesetzt, jedoch meist ohne Rücksicht auf ihre Fähigkeit zur Exotoxinbildung. Die mit Abstand meisten Arbeitsgruppen bedienten sich allerdings gereinigtem LPS. Inwieweit bakterielle porenbildende Exotoxine zur Entstehung der Sepsis und des septischen Herzversagens beitragen, ist vergleichsweise wenig untersucht. Dabei zeigen gerade ECH und  $\alpha$ -Toxin als Exotoxine der beiden mit Abstand häufigsten Sepsiserreger erhebliche pathogenetische Relevanz. An isolierten Lungen konnte durch beide Toxine eine der septischen Schocklunge entsprechende pulmonalarterielle Hypertonie mit Ödembildung induziert werden. Das Auftreten von Mikrozirkulationsstörungen wurde durch die pulmonalarterielle Perfusion beider Toxine im gleichen Lungenmodell, für ECH aber auch im Darm nachgewiesen (44, 47, 49).  $\alpha$ -Toxin und ECH erzeugten in isolierten Herzen Einbußen der Kontraktilität mit massivem Anstieg des coronaren Perfusionsdruckes (90, 144). Ein pathogenetisches Konzept der Toxine besteht in einer Stimulation des Arachidonsäuremetabolismus mit konsekutiv verstärkter Freisetzung vasoaktiver Eicosanoide (48, 90, 114, 116). Diese kommen neben verschiedenen anderen vasoaktiven Substanzen als potentielle Störer der myokardialen Mikrozirkulation in Betracht. Die in der Sepsis auftretenden Perfusionsinhomogenitäten könnten somit unter anderem auch durch isolierte porenbildende Exotoxine induziert werden. Deshalb wurden die isolierten Exotoxine ECH und  $\alpha$ -Toxin in dieser Arbeit an isoliert perfundierten Rattenherzen untersucht. In Abwesenheit zirkulierender Blutzellen und plasmatischer Mediatorsysteme sollte die direkte Wirkung der Toxine auf das Coronarsystem, die myokardiale Perfusion und eine mögliche Beteiligung autochtoner Mediatorsysteme untersucht werden.

## **6.2 Die Anwendung gefärbter Mikrosphären am isoliert perfundierten Rattenherz**

Die Messung der regionalen Gewebsperfusion erfolgte schon früh durch in das Kapillarbett des zu untersuchenden Organs applizierte Mikropartikel, die nach Embolisation der Kapilla-

ren in histologischen Schnitten ausgezählt wurden. Exakter ist die seit den sechziger Jahren etablierte Bestimmung des regionalen Flusses mit Radioisotop-markierten Mikrosphären, die jedoch mit großem technischen Aufwand und radioaktivem Abfall verbunden ist. Neben dieser Methode ist seit einigen Jahren das von Kowallik et al. 1990 entwickelte wenig aufwendige und kostengünstige Verfahren mit gefärbten Mikrosphären in Gebrauch (134). Diese werden durch Auflösung des Gewebes zurückgewonnen und gereinigt. Danach wird ihre Farbe herausgelöst und die Absorption dieser farbigen Lösung photometrisch bestimmt. Aus der Absorption kann aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes die absolute Mikrosphärenanzahl aus einer Teilprobe errechnet und so der regionale Fluß bestimmt werden. Die Injektion verschiedenfarbiger Mikrosphären ergaben somit Momentaufnahmen der regionalen Perfusion zum Injektionszeitpunkt. Das Verfahren ist in 4.2.2. ausführlich beschrieben. Die Effizienz dieser Methode ist vielfach überprüft und bestätigt worden. Vergleiche dieser Methode mit dem etablierten Verfahren zur Bestimmung des regionalen myokardialen Blutflusses (RMBF) mit radioaktiven Mikrosphären zeigen gleichwertige Meßergebnisse (134, 135). Hiller et al. untersuchten die Anwendbarkeit dieser Methode erstmalig am isolierten Rattenherz und konnten auch für diese relativ geringe Gewebemenge den Gebrauch gefärbter Mikrosphären empfehlen (133). In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendbarkeit gefärbter Mikrosphären in der Langendorffperfusion erneut überprüft und bestätigt (4.2.2.6.-4.2.2.9.). Es zeigten sich in der angewendeten Dosierung keine negativen Einflüsse der Mikrosphären auf die Herzfunktion und in den einzelnen Proben fanden sich Mikrosphärenzahlen, welche für statistisch aussagekräftige Berechnungen ausreichten. Die „recovery-rate“ der Mikrosphären betrug 80-90%. Der konstante Verlust von Mikrosphären im Versuch könnte durch Adsorption an Kunststoffflächen und Verluste während der Aufarbeitung der Myokardproben erklärt werden, da im Organeffluat keine Mikrosphären nachgewiesen werden konnten. Bei der Berechnung des RMF (regionaler myokardialer Perfusatfluß) kommt jedoch der systematische Verlust nicht zum Tragen, da zur Bestimmung der regionalen Perfusion für jedes Herz der relative Anteil der Teilprobe an der insgesamt im Herzen wiedergefundenen Mikrosphärenzahl entscheidend ist. Die Ergebnisse des RMF in der Kontrollgruppe dieser Arbeit liegen generell höher als die Messungen von Hiller et al. (133). Dies kann im unterschiedlichen Versuchsaufbau begründet liegen, der einen direkten Vergleich nur bedingt zuläßt. Dennoch entsprechen sich die Ergebnisse des Quotienten aus endo- / epikardialen RMF. Hiller et al. zeigten, daß bei steigendem CPF der Quotient ebenfalls stieg, das heißt, daß endokardiale Myokardabschnitte vergleichsweise stärker perfundiert wurden. Sie bestätigten damit Beobachtungen von Walland et al. (136).

Während bei 10 ml/min der Quotient 0,96 betrug, lag er bei 25 ml/min bei 1,31. In der vorliegenden Untersuchung ergab die flußkonstante Perfusion mit 10-12 ml/min/g (CPP ca. 54,4 mmHg) einen Quotienten von 1,2 (+/- 0,1), bei druckkonstanter Perfusion mit 75 mmHg (CPF ca. 17,7 ml/min/g) 1,25 (+/- 0,1) im steady-state. Walland et al. (136) erreichten bei einem CPP von 58,8 mmHg einen Quotienten von 1,59. Auch in vivo wurde eine physiologischerweise heterogene Verteilung der Perfusion im linken Ventrikel mit höherem endokardialem RMF gegenüber epikardialen Anteilen mittels radioaktiver Mikrosphären bestätigt. Groeneveld et al. (53) ermittelten in Hundeherzen einen Quotienten von 1,53 (+/-0,25), Malik et al. (137) in Rattenherzen einen Quotienten von 1,09 (+/-0,09) (53, 137).

### **6.3 ECH und $\alpha$ -Toxin verursachen ausgeprägte Störungen der Herzfunktion und der myokardialen Mikrozirkulation**

Die isolierten bakteriellen Exotoxine ECH und  $\alpha$ -Toxin zeigten beide eindeutige kardio-depressive Effekte. Zum einen konnte eine erhebliche Vasokonstriktion in der coronaren Strombahn durch beide Toxine erzeugt werden. Im flußkonstanten Verfahren uberte sich diese in einem massiven Anstieg des CPP (coronaren Perfusionsdruckes), im druckkonstanten Verfahren entsprechend mit Abfall des CF (coronaren Perfusionsflusses). Diese Veränderung war von einem zeitgleichen Abfall der Pumpfunktion begleitet. Beide Effekte traten unmittelbar nach Toxinapplikation ein und hielten über den gesamten Versuchszeitraum an. Das Modell der flußkonstanten Perfusion zeigt, daß der Abfall der Herzkontraktilität nicht lediglich auf eine globale Ischämie zurückzuführen ist, die bei druckkonstanter Perfusion durchaus denkbar wäre. Sie gewährleistete selbst bei erhöhtem coronaren Gefäßwiderstand eine konstante globale Perfusion des Myokards. Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen vorherigen Beobachtungen von Sibelius et al. zur Wirkungsweise von  $\alpha$ -Toxin und ECH am flußkonstant perfundierten isolierten Rattenherz (90, 144). Während die verwendeten Toxine auf Herzfunktion und coronaren Gefäßtonus gleichgerichtete Wirkungen zeigten, konnten in der vorliegenden Arbeit auf mikrozirkulatorischer Ebene deutliche Unterschiede zwischen beiden Toxinen nachgewiesen werden. Prinzipiell ergaben die Messungen des RMF in der linken Ventrikelwand unter ECH-Einfluß eine endokardial betonte Minderperfusion, wogegen durch  $\alpha$ -Toxin eine epikardial betonte Minderperfusion erfolgte. In der flußkonstanten Perfusion wurde dieser Effekt besonders deutlich, da hier modellbedingt nicht generell in allen Myokardarealen eine Fluabnahme stattfinden konnte. Der Einbruch des RMF beschränkte sich hier auf die linke Ventrikelwand, wobei das Perfusat vermehrt über andere Herzanteile abfließen mußte.

ECH verursachte im endokardialen Gewebsabschnitt einen signifikanten Abfall der Perfusion, wogegen die Perfusion in den epikardialen Abschnitten nahezu unverändert blieb. Unter  $\alpha$ -Toxin zeigte sich der umgekehrte Befund: Der RMF nahm nur in den epikardialen Abschnitten ab. Bei der druckkonstanten Perfusion kam es durch die coronare Einschwemmung beider Toxine zu einem deutlichen Perfusionsrückgang in allen untersuchten Myokardabschnitten. Interessanterweise blieb in diesem physiologischen Versuchsansatz die endokardial stärker betonte Minderperfusion durch ECH genauso erhalten wie der epikardial überbetonte Perfusionsrückgang im Falle des  $\alpha$ -Toxins. Die druckkonstante Perfusion wurde in dieser Arbeit zusätzlich eingesetzt, um Vorgänge in der regionalen Perfusion auch unter diesen physiologischen Verhältnissen nachvollziehen zu können und eine mögliche durch stark steigenden CPP bei Flußkonstanz bedingte Artefaktbildung in der RMF-Bestimmung auszuschließen. Die Quotienten aus ENDO/EPI (endokardiale myokardiale Perfusion der linken Ventrikelwand/epikardiale myokardiale Perfusion der linken Ventrikelwand) ermöglichen einen genaueren Vergleich der Perfusionsverhältnisse in der linken Ventrikelwand. Die prozentuale Abweichung des Quotienten vom Ausgangswert erfolgt in entgegengesetzter Richtung: ECH bewirkte einen Abfall,  $\alpha$ -Toxin einen Anstieg des Quotienten. Die Werte der beiden Toxingruppen unterscheiden sich somit grundlegend voneinander. Diese Daten deuten darauf hin, daß die beiden Toxine ihre Wirkung auf die Mikrozirkulation über unterschiedliche Mechanismen ausüben könnten.

Es sei darauf hingewiesen, daß sämtliche Effekte ausschließlich auf die Wirkung der bakteriellen Toxine zurückzuführen sind. Zum einen wurde eine Kontamination der Toxine mit LPS (Lipopolysacchariden) ausgeschlossen (4.2.5). Zum anderen wurden grundsätzlich gereinigte und sterilisierte Schlauchsysteme und Glasgefäße eingesetzt, so daß eine LPS-Kontamination durch weitere Keime ausgeschlossen werden konnte. Inwieweit die eingesetzten Toxindosierungen dem Toxinblutspiegel von im septischen Organismus entsprechen, bleibt letztlich unklar. Die hier verwendeten Dosierungen stimmen allerdings mit denen anderer Untersuchungen gut überein (47-50, 90, 144).

#### **6.4 Die Freisetzung verschiedener vasoaktiver Arachidonsäuremetabolite durch $\alpha$ -Toxin und ECH spiegelt sich in unterschiedlichen regionalen Perfusionsstörungen wieder**

Durch pharmakologische Interventionen konnten die toxininduzierten Veränderungen vollständig oder zumindest teilweise verhindert werden. Im Falle des  $\alpha$ -Toxins wurde in der vorliegenden Arbeit der Cyclooxygenaseinhibitor Indomethacin eingesetzt. Dieser unterbindet

die Bildung von Prostacyclin, Prostaglandinen und Thromboxan aus AA. In den Untersuchungen von Sibelius et al. konnten die durch  $\alpha$ -Toxin hervorgerufenen kardialen Funktionsstörungen auf eine ausschließliche Aktivierung der Thromboxan (Tx) A<sub>2</sub>-Synthese zurückgeführt werden (90). Dies gelang in der zitierten Arbeit durch folgende verschiedene Experimente:

- a) Bei Herzperfusionen mit  $\alpha$ -Toxin konnte TxA<sub>2</sub> direkt im Perfusat nachgewiesen werden, jedoch keine Leukotriene.
- b) Der Cyclooxygenaseinhibitor Acetylsalicylsäure konnte ebenso wie Indomethacin die  $\alpha$ -Toxin- bedingten Funktionsstörungen aufheben.
- c) Der TxA<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist Daltroban konnte ebenfalls die Funktionsstörungen aufheben.
- d) Der Lipoxygenaseinhibitor NDGA beeinflusste die Funktionsstörungen nicht.

Aufgrund dieser umfangreichen im selben Laborbereich gewonnenen Erkenntnisse wurde in vorliegender Arbeit auf eine weitere Eingrenzung von TxA<sub>2</sub> als Vermittler der  $\alpha$ -Toxin- Wirkung am Rattenherz verzichtet.

Die pathophysiologische Relevanz dieses vasoaktiven Eicosanoids konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nur bestätigt, sondern erheblich erweitert werden. Indomethacin konnte hier die Wirkungen des  $\alpha$ -Toxins auf die funktionellen Parameter vollständig bzw. deutlich verringern. Zusätzlich aber konnte auch die epikardiale Minderperfusion durch Indomethacin aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, daß die  $\alpha$ -Toxin- induzierte Bildung von TxA<sub>2</sub> für die mikrozirkulatorische Verteilungsstörung verantwortlich sein könnte. Der Ort der Thromboxansynthese konnte bisher nicht genauer lokalisiert werden (95).

Der Lipoxygenaseinhibitor MK886 verhindert die Bildung von Leukotrienen aus AA. Da dieses Pharmakon die Veränderungen sämtlicher erhobener Parameter durch ECH erheblich abschwächte, ist wahrscheinlich, daß die Wirkung von ECH überwiegend auf der Stimulation der Leukotriensynthese beruht. Diese Behauptung untermauern Arbeiten von Sibelius et al. (144). Es konnten in diesen Arbeiten durch folgende Tests eindeutig Leukotriene als verantwortliche Mediatoren der ECH-Wirkung am Rattenherz ermittelt werden:

- a) MK886 konnte die toxininduzierten Funktionsstörungen unterbinden.
- b) Im Perfusat konnten Leukotriene nachgewiesen werden.
- c) Indomethacin und Acetylsalicylsäure waren wirkungslos.

Aufgrund dieser im selben Laborbereich gewonnenen Erkenntnisse wurde in vorliegender Arbeit auf eine weitere Eingrenzung von Leukotrienen als Vermittler der ECH- Wirkung am Rattenherz verzichtet.

Unter den Leukotrienen steht LTC<sub>4</sub> besonders in Verdacht, im Herz eine Rolle zu spielen. Nicht nur sein konstriktorischer Effekt auf die coronare Zirkulation, sondern auch eine Synthese in Coronararterien sind nachgewiesen worden (88, 138). Die Herkunft der natürlichen Eicosanoide im isolierten Rattenherz ist relativ unklar, obwohl im Coronareffluat mit und ohne Toxineinwirkungen erhöhte Eicosanoidspiegel nachgewiesen wurden (61, 90, 138, 144). Als Orte der Leukotriensynthese kommen endothelassoziierte oder gewebsständige Leukozyten, Monozyten und Mastzellen in Frage (140, 141). Dabei wurde auch eine Kooperation zwischen Neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen im Herz beobachtet (94).

Wie isolierte Exotoxine die Bildung vasoaktiver Mediatoren am Herz hervorrufen, ist zur Zeit noch unklar. In vitro Untersuchungen an isolierten Endothelzellen weisen jedoch darauf hin, daß porenbildende Exotoxine über einen Ioneneinstrom die Zielzelle aktivieren können (130, 139). Im Falle von ECH gilt eine Stimulation des AA-Metabolismus durch den Einstrom von Kalziumionen mittlerweile als gesichert (113, 130, 139). Dieser Mechanismus wurde auch für  $\alpha$ -Toxin angenommen, doch neuere Ergebnisse sprechen nicht für eine Passierbarkeit der bivalenten Kalziumionen durch die  $\alpha$ -Toxin-Pore in sublytischen Dosen (113). Prinzipiell ist nicht auszuschließen, daß durch eine Störung der Natrium-Kalium-Homöostase der Endothelzelle der AA-Metabolismus aktiviert wird. Letztendlich ist anzunehmen, daß in der vorliegenden Untersuchung die porenbildenden Exotoxine zwei unterschiedliche Wege der Eicosanoidsynthese in ihren kardialen Zielzellen aktiviert haben, wodurch diese zur Quelle der vasoaktiven Eicosanoide wurden. Es ist somit offensichtlich, daß die genannten Eicosanoide in isoliert und zellfrei perfundierten Rattenherzen als Mediatoren der Toxizität von ECH und  $\alpha$ -Toxin agieren. Dies gilt nicht nur für die Herzfunktion, sondern auch für die Veränderungen der mikrozirkulatorischen Verhältnisse. Die verschiedenartigen durch ECH und  $\alpha$ -Toxin induzierten Verteilungsstörungen der Perfusion im linken Ventrikel waren aufgrund der pharmakologischen Intervention -gekoppelt mit den Erkenntnissen von Sibelius et al. (90, 144)- auf die Wirkung vasoaktiver Eicosanoide zurückzuführen. Sie sind möglicherweise durch eine anatomisch unterschiedliche Eicosanoid-Rezeptorausstattung oder -Synthesefähigkeit endo- und epikardialer Endothelzellen im Herz bedingt. Weiterhin wäre eine besonders epikardial gesteigerte Tx-Produktion bzw. endokardial gesteigerte LT-Produktion denkbar. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen auf zellulärer Ebene unabdingbar.

## **6.5 Myokardiale Mikrozirkulationsstörungen – ein wesentlicher Beitrag zur Abnahme der Herzkontraktilität unter Einwirkung porenbildender Exotoxine**

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, daß ECH und  $\alpha$ -Toxin (über eine Freisetzung jeweils verschiedener Eicosanoide) erhebliche Alterationen der myokardialen Mikrozirkulation erzeugen. Diese erfolgen im Falle von ECH in Form einer Umverteilung des Perfusionsflusses in der linken Ventrikelwand von endokardialen in epikardiale Bereiche des Myokards. Da der Sauerstoffbedarf im Endokard physiologischerweise höher liegt (142), ist hierbei von einem pathologischen Effekt auszugehen, der für die Abnahme der Herzkontraktilität verantwortlich sein kann (14). Dieses Ergebnis entspricht den Studien von Groeneveld et al., die in endotoxämischen Hunden mit radioaktiv markierten Mikrosphären Verteilungsstörungen im heterogenen Blutfluß des Herzens nachweisen konnten. Diese von verminderter Herzleistung begleiteten Störungen zeigten sich unter anderem auch in einem Rückgang der endokardialen Perfusion (53). Dies bestätigte Beobachtungen von Kleinman et al., daß Endotoxin in Hundeherzen besonders subendokardiale Schichten ischämisch schädigte (143). Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß das eingesetzte ECH frei von LPS war (4.2.5).

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit durch  $\alpha$ -Toxin eine genau umgekehrte Verteilungsstörung im linken Ventrikel induziert werden. Dadurch sind zwar endokardiale Anteile vergleichsweise besser versorgt, trotzdem kann die epikardial betonte Minderperfusion zur Kontraktilitätsabnahme des linken Ventrikels führen. Wie schon erwähnt, sind Störungen der Mikrozirkulation in anderen Organen (44-47, 49, 51) und prinzipiell auch im Herz (23, 43, 54, 90) als septischer Pathomechanismus mit Funktionseinbußen mehrfach nachgewiesen worden. Im Herz kann das Vorhandensein von Mikrozirkulationsstörungen mit fokalen Ischämien aufgrund der geringen hypoxischen Toleranz in Einbußen der Kontraktilität resultieren, auch wenn die Gesamtpfusion des Organs erhalten bleibt. Untersuchungen zur Myokardperfusion am Mensch und Tier weisen darauf hin (23, 43, 90). Zwar könnte auch eine direkt zytotoxische Wirkung der Toxine zur Abnahme der Kontraktilität führen, doch ließe sich diese Zytotoxizität nicht mit den verwendeten Inhibitoren unterbinden. Die Abnahme der Herzleistung war insgesamt jedoch eindeutig trotz Anwesenheit der Toxine pharmakologisch erheblich zu verbessern und so mit der Synthese der Eicosanoide zu vereinbaren. Deshalb kann auch nicht von einer direkt negativ inotropen Wirkung der Toxine ausgegangen werden. Allenfalls ein negativ inotroper Effekt der Eicosanoide ist denkbar. Im Falle von Thromboxan ist bisher kein direkt negativ inotroper Effekt bekannt und die Beobachtungen

von Roth et al. schlossen diesen auch für LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> aus (88). Schließlich bleibt noch die Möglichkeit, daß die durch beide Toxine beobachtete Ödembildung die Herzkontraktilität beeinträchtigt hat. Daß ECH und  $\alpha$ -Toxin zur endothelialen Schrankenstörung durch interzelluläre Spaltenbildung führen, konnte an verschiedenen Modellen gezeigt werden (117, 123, 130). Der Einsatz von MK886 und Indomethacin beeinflusste in der vorliegenden Arbeit nicht die Bildung eines Ödems, obwohl die Herzleistung verbessert wurde. Das weist auf die relative Unabhängigkeit des akut auftretenden Herzkontraktilitätsverlustes vom Ödem hin. Inwieweit eine Ödembildung im Herz protrahierte Effekte auf die Pumpfunktion hat, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse und Betrachtungen darauf hin, daß die linksventrikuläre Perfusionsstörung unter Einfluß der Exotoxine ECH und  $\alpha$ -Toxin die Herzleistungsminderung hervorrufen. Angesichts der inzwischen als gesichert geltenden pathophysiologischen Relevanz dieser Exotoxine könnten beschriebene Mechanismen auch an der Pathogenese der in der Sepsis beobachteten klinischen Herzfunktionsstörung beteiligt sein.

## **6.6 Die Klinische Relevanz der Ergebnisse**

Obwohl die Anwesenheit bakterieller Exotoxine für die Pathogenese der Sepsis und der Erscheinung der septischen Kardiomyopathie nicht zwingend erforderlich ist, gilt ihr Beitrag zu diesem Krankheitsgeschehen mittlerweile als gesichert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese Erkenntnisse in mehrfacher Hinsicht. Zum einen bestätigen sie, daß Bakterien auch in ihrer Abwesenheit über sezernierte Pathogenitätsfaktoren maßgebliche Schäden im Zielorgan anrichten können. Dazu bedarf es nicht ausschließlich der Endotoxine gramnegativer Keime, sondern auch Exotoxine gramnegativer und grampositiver Sepsiserreger wie *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* können Schäden anrichten. Es zeigt sich dabei, daß diese prinzipiell nicht von der Mitwirkung humoraler Faktoren abhängig sind, sondern auch durch Aktivierung autochtoner Mediatorsysteme im Zielorgan Herz erfolgen können. Zum anderen ergaben die vorliegenden Untersuchungen neue Hinweise, daß ECH und  $\alpha$ -Toxin als Prototypen bakterieller porenbildender Exotoxine gleichermaßen erhebliche Störungen der myokardialen Mikrozirkulation verursachen, die in einer Abnahme der Herzleistung resultieren. Die Bedeutung des in anderen septischen Organen, wie Lunge, Darm und Skelettmuskulatur erforschten pathogenetischen Prinzips der Mikrozirkulationsstörung ist durch die vorliegenden Ergebnisse auch für das Herz genauer charakterisiert worden. Interessanterweise entfaltet sich diese Wirkung augenscheinlich über unterschiedliche Mediatorsys-

teme, die zu Minderperfusionen jeweils unterschiedlich lokalisierter Myokardareale führen. Diese Ergebnisse relativieren dadurch insgesamt die Bedeutung der Zytokine an der Entstehung der septischen Kardiomyopathie.

## 7 Zusammenfassung

Die Klinik der Sepsis ist mit einer Herzinsuffizienz assoziiert, die als septische Kardiomyopathie bezeichnet wird. Im einzelnen besteht diese trotz erhöhten Herzminutenvolumens vorliegende Insuffizienz des Herzens in einer Dilatation beider Ventrikel und Hypokinesien des Myokards. Funktionell folgen daraus verminderte biventrikuläre Auswurfractionen, eine erhöhte Compliance und letztendlich die Unfähigkeit des Herzens, durch Anstieg des Herzminutenvolumens den erheblichen systemischen Blutdruckabfall des septischen Patienten adäquat zu kompensieren. In vielen Fällen trägt diese Erkrankung deshalb zum therapierefrak-tären kardiovaskulären Kollaps bei, der in ca. 50% der Fälle zum Tode des Patienten führt. In diesem Zusammenhang ist die Bedeutung bakterieller Pathogenitätsfaktoren schon früh erkannt worden, doch standen Untersuchungen mit lebenden Keimen, besonders aber mit Endotoxinen immer im Mittelpunkt der Forschung. Inwieweit bakterielle Exotoxine beteiligt sein können, ist vergleichsweise unbekannt. *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* stellen nicht nur die häufigsten Erreger septischer Krankheitsbilder dar, sondern sind als Bildner von Exotoxinen bekannt, welche maßgebliche Bedeutung für die Virulenz der entsprechenden Bakterienstämme haben. Die extraintestinal bedeutsamsten Exotoxine,  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* Hämolyysin, gelten als Prototypen porenbildender Hämoly-sine. Ihre pathophysiologische Bedeutung in der Sepsis ist in Zellkulturen, isolierten Organen und Ganztiermodellen nachgewiesen worden. Die Aktivierung betroffener Zellen durch sublytische Dosen scheint dabei das charakteristische pathophysiologische Konzept dieser Porenbildner zu sein. Untersuchungen an Lungen, Darm und Herz ergaben Hinweise auf die Beteiligung des Arachidonsäurestoffwechsels mit Freisetzung vasoaktiver Eicosanoide. Die Induktion von Mikrozirkulationsstörungen durch diese Mediatoren konnte bisher in Lunge und Darm, nicht aber für das Herz eindeutig nachgewiesen werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit mittels gefärbter Mikrosphären die regionale Perfusion verschiedener Myokardareale isoliert und zellfrei perfundierter Rattenherzen unter Einwirkung der genannten Toxine bestimmt. Diese Messungen können Veränderungen der regionalen Perfusionsintensität in kleinen Gewebemengen quantifizieren. Gleichzeitig wurden Parameter der Herzfunktion erfaßt. Es sollten dabei Pathomechanismen beider Exotoxine und mögliche Unterschiede genauer herausgearbeitet werden. Die Applikation beider Toxine in die coronare Strombahn bewirkte eine erhebliche coronare Gefäßwiderstandserhöhung und Abnahme der

Kontraktilität des Herzens. Die Untersuchungen der Mikrozirkulation ergaben toxininduzierte Verteilungsstörungen der Perfusion zwischen endokardialen und epikardialen Myokardschichten der freien linken Ventrikelwand. Interessanterweise erzeugte ECH eine Minderperfusion endokardial gelegener,  $\alpha$ -Toxin eine Minderperfusion epikardial gelegener Myokardareale. Dies deutet auf die Beteiligung unterschiedlicher Mediatorsysteme hin. Bestätigt wurde dies durch den Einsatz jeweils eines Cyclooxygenase- und eines Lipoxygenaseinhibitors. Im Falle des  $\alpha$ -Toxins konnte durch die Blockierung der Cyclooxygenase die coronare Vasokonstriktion, die Kontraktilitätsabnahme und die Perfusionsumverteilung signifikant verringert werden, was die Rolle von  $\text{TxA}_2$  als vasoaktives Agens nahelegt. Bei ECH zeigte die Blockierung der Lipoxygenase eine entsprechende Wirkung. Hier deuten die Ergebnisse auf die Beteiligung der Leukotriensynthese hin. Zudem scheinen die genannten Eicosanoide nicht nur für die Störung der myokardialen Mikrozirkulation im Sinne einer Verteilungsstörung verantwortlich zu sein, sondern führen erstaunlicherweise über diese Perfusionsinhomogenitäten offensichtlich auch zur Abnahme der Herzleistung. Diese Entdeckung relativiert die vielbeachtete Rolle kardiodepressiv wirkender Zytokine in der septischen Kardiomyopathie. Sie bestätigt nicht nur die pathogenetische Relevanz bakterieller Exotoxine bei der Entstehung der Sepsis, sondern verifiziert den Verdacht, daß die in anderen Organen schon charakterisierten Mikrozirkulationsstörungen auch im Herz durch Freisetzung vasoaktiver Lokalmediatoren zur septischen Organschädigung beitragen.

## 8 Summary

Cardiac performance is severely depressed in sepsis and septic shock. The morphological and functional alterations are known as septic cardiomyopathy and consist of reduced left and right ventricular ejection fractions, myocardial hypokinesis and dilatation of both ventricles. The heart is not able to compensate the fall in systemic blood pressure of the septic patient, although heart rate is highly elevated. This contributes to therapy resistant cardiovascular collapse which in 50% of all cases is lethal. In this context bacterial pathogenicity factors obviously play an important part. Since early sepsis research everybody focused on viable bacteria or endotoxins, relatively little is known about the pathophysiological significance of bacterial exotoxins yet. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are well known rods to cause sepsis. Some of their isolates produce bacterial exotoxins, which represent potent

virulence factors. The most important exotoxins outside the intestinal tract,  $\alpha$ -toxin of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* hemolysin, represent prototypes of bacterial pore-forming exotoxins. Their pathophysiological relevance in sepsis was extensively demonstrated in cell cultures, isolated organs and animal models. The characteristic pathophysiological concept of these toxins seems to be their ability to activate target cells in sublytic doses. Investigations in isolated lungs, intestine and hearts clearly demonstrated the significance of arachidonic acid metabolism followed by the production of vasoactive eicosanoids. The induction of microcirculatory failure by these eicosanoids has already been shown in lung and intestine models, but not clearly in hearts. Therefore, the aim of this investigation was to measure regional myocardial perfusion in the isolated, buffer perfused rat heart challenged with these toxins, using the coloured dye-extraction microsphere-technique. This technique is suitable to quantify changes in microcirculation even in little pieces of tissue. Simultaneously, parameters of heart performance were monitored. Furthermore, the aim was to characterize pathomechanisms of both pore-forming toxins and to look for eventual differences between them. The application of both toxins in the coronary vasculature resulted in a strong vasoconstriction and a loss in contractility of the hearts. Microcirculatory changes resulted from a maldistribution of perfusion between endocardial and epicardial layers of the left ventricular free wall. It is of interest that ECH caused a loss of perfusion in endocardial layers, while  $\alpha$ -toxin caused a loss in epicardial layers of the left ventricular myocardium. These findings suggest that different systems of mediators are responsible for the effects of the exotoxins used. They were confirmed with the use of a cyclooxygenase-inhibitor and a lipoxygenase-inhibitor. In the case of  $\alpha$ -toxin it was possible to reduce the coronary vasoconstriction, loss in contractility and loss in epicardial perfusion by blocking the cyclooxygenase, which suggests  $\text{TxA}_2$  as the main acting vasoconstrictory agent. In case of ECH the lipoxygenase-inhibition showed the same effects. Here toxin-effects seem to be mediated by leukotrienes. Synthesis of eicosanoids in response to bacterial exotoxins may be responsible for microcirculatory alterations followed by the loss in myocardial performance. These findings weaken the high status of negative inotropic cytokines in septic cardiomyopathy. They emphasize not only the importance of bacterial exotoxins in sepsis, but demonstrate that microcirculatory alterations, as seen in many other organs in sepsis, contribute to organ failure even in the heart.

## 9 Literaturverzeichnis

- (1) Parrillo, J.E., moderator: Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann. Intern. Med.* 1990; 113: 227-242.
- (2) Bone, R.C.. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure. A plea for comparable definitions. *Ann. Intern. Med.* 1991; 114: 332-333.
- (3) Groeneveld, A.B.J., W. Bronsveld, L.G. Thijs. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery.* 1986; 90: 140-152.
- (4) Parker, M.M., J.H. Shelhamer, C. Natanson, D.W. Alling, J.E. Parrillo. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: Heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit. Care. Med.* 1987; 15: 923-929.
- (5) Werdan, K., P. Boekstegers, U. Müller, A. Pfeifer, G. Pilz, C. Reithmann, S. Hallström, B. Koidl, H. P. Schuster, G. Schlag. Akute septische Kardiomyopathie: Bestandteil des Multiorganversagens in der Sepsis ? *Med. Klin.* 1991; 86: 526-534.
- (6) Vincent, J.L., P. Gris, M. Coffernils, M. Leon, M. Pinsky, C. Reuse, R.J. Kahn. Myocardial depression characterizes the fatal course of septic shock. *Surgery.* 1992; 111 (6): 660-7.
- (7) Parker, M.M., J.H. Shelhamer, S.L. Bacharach, M.V Green, C. Natanson, T.M. Frederick, B.A Damske, J.E. Parillo. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann. Intern. Med.* 1984; 100: 483-490.
- (8) Parker M.M., K. McCarthy, F.P. Ognibene, J.E. Parrillo. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest.* 1990; 97: 126-131.

- (9) Vincent J.L., C. Reuse, N. Frank, B. Contempre, R.J. Kahn. Right ventricular dysfunction in septic shock : assessment by measurements of right ventricular ejection fraction using the thermodilution technique. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 1989; 33: 34-38.
- (10) Ozier, Y., P. Gueret, F. Jardin, J.C. Farcot, J.P. Bourdarias, A. Margairaz. Two-dimensional echocardiographic demonstration of acute myocardial depression in septic shock. *Crit. Care. Med.* 1984; 12: 596-599.
- (11) Kimchi, A., A. G. Ellrodt, D. S. Bergman, M. S. Riedinger, H. J. Swan, G. H. Murata. Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1984; 4 (5): 945-51.
- (12) Ellrodt, A.G., M.S. Riedinger, A. Kimchi, D.S. Berman, J. Maddahi, H.J.C. Swan, G.H. Murata. Left ventricular performance in septic shock: Reversible segmental and global abnormalities. *Am. Heart. J.* 1985; 110: 402-409.
- (13) Ognibene, F.P., M.M. Parker, C. Natanson, J.H. Shelhamer, J.E. Parrillo. Depressed left ventricular performance: response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest.* 1988; 93: 903-910.
- (14) Cunnion, R.E., G.L. Schaer, M.M. Parker, C. Natanson, J.E. Parrillo. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation.* 1986; 73: 637-644.
- (15) Bloos, F., W.J. Sibbald. Cardiocirculation in sepsis. In: Reinhart, K., K. Eyrich, C. Sprung, eds. Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy. Berlin, Heidelberg; Springer; 1994: 139-149.
- (16) Natanson, C., M.P. Fink, H.K. Ballantyne, T.J. McVittie, J.J. Conklin, J.E. Parrillo. Gram negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *J. Clin. Invest.* 1986; 78: 259-270.

- (17) Natanson, C., R.L. Danner, M.P. Fink, T.J. McVittie, R.I. Walker, J.J. Conklin, J.E. Parrillo. Cardiovascular performance with E. coli challenges in a canine model of human sepsis. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: H558-H569.
- (18) Stahl, T.J., P.B. Alden, W.S. Ring, R.C. Madoff, F.B. Cerra. Sepsis-induced diastolic dysfunction in chronic canine peritonitis. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: H625-H633.
- (19) McDonough, K.H., C.H. Lang, J.T. Spitzer. Depressed function of isolated hearts from hyperdynamic septic rats. *Circ. Shock.* 1984; 12: 241-251.
- (20) McDonough, K.H., C.H. Lang, J.T. Spitzer. The effect of hyperdynamic sepsis on myocardial performance. *Circ. Shock.* 1985; 15: 247-259.
- (21) Lee, K., H. van der Zee, S.W. Dziuban, Jr., K. Luhmann, R.D. Goldfarb. Left ventricular function during chronic endotoxemia in swine. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: H324-H330.
- (22) Goldfarb, R.D., K.J. Lee, T. Andrejuk, S.W. Dziuban, Jr.. End-systolic elastance as an evaluation of myocardial function in shock. *Cir. Shock.* 1990; 30: 15-26.
- (23) Bloos, F.M., H.M. Morisaki, A.M. Neal, C.M. Martin, C.G. Ellis, W.J. Sibbald, M.L. Pitt. Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1996; 153 (5): 1577-84.
- (24) Adams, H.R., J.L. Parker, M.H. Laughlin. Intrinsic myocardial dysfunction during endotoxemia: dependent or independent of myocardial ischemia ? *Circ. Shock.* 1990; 30 (1): 63-76.
- (25) Kumar, A., C. Haery, J.E. Parrillo. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit. Care. Clin.* 2000; 16 (2): 251-87.

- (26) Parrillo, J.E., C. Burch, J.H. Shelhamer, M.M. Parker, C. Natanson, W. Schuette. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1539-1553.
- (27) Kumar, A., V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, J.E. Parrillo. Tumor necrosis factor alpha and Interleukin 1 $\beta$  are responsible for in vitro myocardial depression induced by human septic shock serum. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 949-958.
- (28) Yokoyama, T., L. Vaca, R.D. Rossen, W. Durante, P. Hazarika, D.L. Mann. Cellular basis for the negative inotropic effect of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 2303-2312.
- (29) Meng, X., L. Ao, D.R. Meldrum, B.S. Cain, B.D. Shames, C.H. Selzman, A. Banerjee, A.H. Harken. TNF-alpha and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: R502-8.
- (30) Hosenpud, J.D., S.M. Campbell, D.J. Mendelson. Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J. Heart. Transplant.* 1989; 8: 460-464.
- (31) Weisensee, D., J. Bereiter-Hahn, W. Schoeppe, I. Low-Friedrich. Effects of cytokines on the contractility of cultured cardiac myocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 1993; 15 (5): 581-7.
- (32) Damas, P., A. Reuter, P. Gysen, J. Demonty, M. Lamy, P. Franchimont. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit. Care. Med.* 1989; 17 (10): 975-8.
- (33) Damas, P., J.L. Canivet, D. de Groote, Y. Vrindts, A. Albert, P. Franchimont, M. Lamy. *Crit. Care. Med.* 1997; 25 (3): 405-12.

- (34) Schirmer, W.J., J.M. Schirmer, D.E. Fry. Recombinant human tumor necrosis factor produces hemodynamic changes characteristic of sepsis and endotoxemia. *Arch. Surg.* 1989; 124: 445-448.
- (35) Pinsky, M.R., J.L. Vincent, J. Deviere, M. Alegre, R.J. Kahn, E. Dupont. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest.* 1993; 103 (2): 565-75.
- (36) Fisher, C.J., S.M. Opal, J.F. Dhainaut, S. Stephens, J.L. Zimmermann, P. Nightingale, S.J. Harris, R.M. Schein, E.A. Panacek, J.L. Vincent. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit. Care. Med.* 1993; 21 (3): 318-27.
- (37) Kraut, E.J., S. Chen, N.E. Hubbard, K.L. Erickson, D.H. Wisner. Tumor necrosis factor depresses myocardial contractility in endotoxemic swine. *J. Trauma.* 1999; 46 (5): 900-6.
- (38) Bozkurt, B., S.B. Kribbs, F.J. Clubb, L.H. Michael, V.V. Didenko, P.J. Hornsby, Y. Seta, H. Oral, F.G. Spinale, D.L. Mann. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation.* 1998; 97 (14): 1382-91.
- (39) Reinhart, K., C. Wiegand-Lohnert, F. Grimminger, M. Kaul, S. Withington, D. Treacher, J. Eckart, S. Willatts, C. Bouza, D. Krausch, F. Stockenhuber, J. Edelstein, L. Daum, J. Kempeni. Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit. Care. Med.* 1996; 24 (5): 727-9.
- (40) Kumar, A., R. Brar, P. Wang, L. Dee, G. Skorupa, F. Khadour, R. Schulz, J.E. Parrillo. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: R265-76.

- (41) Cain, B. S., D.R. Meldrum, C.A. Dinarello, X. Meng, K.S. Joo, A. Banerjee, A.H. Harken. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta synergistically depress human myocardial function. *Crit. Care. Med.* 1999; 27 (7): 1309-18.
- (42) Oral, H., G.W. Dorn, D.L. Mann. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 4836-4842.
- (43) Hersch, M., A.A. Gnidec, A.D. Bersten, M. Troster, F.S. Rutledge, W.J. Sibbald. Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery.* 1990; 107: 397-410.
- (44) Mayer, K., B. Temmesfeld-Wollbrück, A. Friedland, H. Olschewski, M. Reich, W. Seeger, F. Grimminger. Severe microcirculatory abnormalities elicited by E. coli hemolysin in the rabbit ileum mucosa. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1999; 160 (4): 1171-8.
- (45) Drazenovic, R., R.W. Samsel, M.E. Wylam, C.M. Doerschuk, P.T. Schumacher. Regulation of perfused capillary density in canine mucosa during endotoxemia. *J. Appl. Physiol.* 1992; 72 (1): 259-265.
- (46) Farquhar, I., C.M. Martin, C. Lam, R. Potter, C.G. Ellis, W.J. Sibbald. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *J. Surg. Res.* 1996; 61 (1): 190-196.
- (47) Walmrath, D., M. Scharmann, R. König, J. Pilch, F. Grimminger, and W. Seeger. Staphylococcal  $\alpha$ -toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 1993; 74 (4): 1972-1980.
- (48) Seeger, W., M. Bauer, S. Bhakdi. Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium. *J. Clin. Invest.* 1984; 74 (3): 849-58.

- (49) Walmrath, D., J. Pilch, M. Scharmann, F. Grimminger, W. Seeger. Severe  $V_A/Q$  mismatch in perfused lungs evoked by sequential challenge with endotoxin and *E. coli* hemolysin. *J. Appl. Physiol.* 1994; 76: 1020-1030.
- (50) Seeger, W., H. Walter, N. Suttorp, M. Muhly, S. Bhakdi. Thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 220-227.
- (51) Piper, R.D., M. Pitt-Hyde, F. Li, W.J. Sibbald, R.F. Potter. Microcirculatory changes in rat skeletal muscle in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1996; 154 (4 Pt 1): 931-937.
- (52) Cryer, H.G., R.N. Garrison, P.D. Harris, B.H. Greenwald, N.L. Alsip. Prostaglandins mediate skeletal muscle arteriole dilation in hyperdynamic bacteremia. *Am. J. Physiol.* 1990; 259 (3 Pt 2): H728-34.
- (53) Groeneveld A.B.J., A.A. van Lambalgen, G.C. van den Bos et al.. Maldistribution of heterogenous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc. Res.* 1991; 25: 80-88.
- (54) Avontuur, J.A.M., H.A. Bruining, and C. Ince. Inhibition of nitric oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ. Res.* 1995; 76: 418-425.
- (55) Davidson, D., D. Drafta. Prolonged pulmonary hypertension caused by platelet-activating factor and leukotriene C4 in the rat lung. *J. Appl. Physiol.* 1992; 73 (3): 955-61.
- (56) Hu, W., A.A.A. Kinnaird, R.Y.K. Man. Mechanisms of the coronary vascular effects of platelet-activating factor in the rat perfused heart. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 103 (1): 1097-1102.

- (57) Bensard, D.D., B.O. Anderson, A. Banerjee, D.W. Nelson, R.S. Poggetti, R.L. Berens, A.H. Harken. Platelet activating factor alters receptor-coupled function in the isolated perfused rat heart. *J. Surg. Res.* 1992 ; 53 (4) : 321-5.
- (58) Clavijo, L.C., M.B. Carter, P.J. Matheson, L.A. Wills-Frank, M.A. Wilson, W.B. Wead, R.N. Garrison. Platelet-activating factor and bacteremia-induced pulmonary hypertension. *J. Surg. Res.* 2000; 88 (2) : 173-80
- (59) Noll, G., R.R. Wenzel, T.F. Luscher. Endothelin and endothelin antagonists : potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol. Cell. Biochem.* 1996; 157 (1-2): 259-67.
- (60) Goerre, S., M. Wenk, P. Bärtsch, T.F. Lüscher, S. Niroomand, E. Hohenhaus, O. Oelz, W.H. Reinhart. Endothelin-1 in pulmonary hypertension associated with high altitude. *Circulation.* 1994; 90: 359-364.
- (61) Zaugg, C.E., P.S. Hornstein, D. Simper, T.F. Lüscher, P.R. Allegrini, P.T. Buser. Endothelin-1-induced release of Thromboxane A<sub>2</sub> increases the vasoconstrictor effect of endothelin-1 in postischemic reperfused rat hearts. *Circulation.* 1996; 94: 742-747.
- (62) Pittet, J.F., D.R. Morel, A. Hensen, K. Gunning, J.S. Lacroix, P.M. Suter, J.M. Lundberg. Elevated plasma endothelin-1 concentrations are associated with the severity of illness in patients with sepsis. *Ann. Surg.* 1991; 213: 261-264.
- (63) Avontuur, J.A., F. Boomsma, A.H. van den Meiracker, F.H. de Jong, H.A. Bruining. Endothelin-1 and blood pressure after inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock. *Circulation.* 1999; 99 (2): 271-5.
- (64) Sharma, A.C., S.J. Motew, S. Farias, K.J. Alden, H.B. Bosmann, W.R. Law, J.L. Ferguson. Sepsis alters myocardial and plasma concentrations of endothelin and nitric oxide in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997; 29 (5): 1469-77.

- (65) Karwatowska-Prokopczuk, E., A. Wennmalm. Effects of endothelin on coronary flow, mechanical performance, oxygen uptake, and formation of purines and on outflow of prostacyclin in the isolated rabbit heart. *Circ. Res.* 1990; 66: 46-54.
- (66) Homma, S., T. Miyauchi, Y. Sugishita, K. Goto, M. Sato, N. Ohshima. Vasoconstrictor effects of endothelin-1 on myocardium microcirculation studied by the Langendorff perfusion method: different sensitivities among microvessels. *Microvasc. Res.* 1992; 43: 205-217.
- (67) Takanashi, M., M. Endoh. Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am. J. Physiol.* 1991; 261: H611-H619.
- (68) Nishikawa, Y., D.W. Stepp, W. M. Chilian. In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation. *Am. J. Physiol.* 1999; 277 (3 Pt 2): H1252-9.
- (69) Kristof, A.S., H. Noorhosseini, S.N. Hussain. Attenuation of endothelium dependent hyperpolarizing factor by bacterial lipopolysaccharides. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 328 (1): 69-73.
- (70) Kessler, P., R. Popp, R. Busse, V.B. Schini-Kerth. Proinflammatory mediators chronically downregulate the formation of the endothelium-derived hyperpolarizing factor in arteries via a nitric oxide/cyclic GMP-dependent mechanism. *Circulation.* 1999; 99 (14): 1878-84.
- (71) Nakashima, Y., Y. Toki, Y. Fukami, M. Hibino, K. Okumura, T. Ito. Role of K<sup>+</sup> channels in EDHF-dependent relaxation induced by acetylcholine in canine coronary artery. *Heart. Vessels.* 1997; 12 (6): 287-93.
- (72) Kimura, K., K. Tsuda, H. Sasajima, M. Shiotani, A. Baba, T. Hano, I. Nishio. Arterial relaxation mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Clin. Exp. Hypertens.* 1999; 21 (7): 1203-21.

- (73) Huang, A., D. Sun, C.J. Smith, J.A. Connetta, E.G. Shesely, A. Koller, G. Kaley. In eNOS knockout mice skeletal muscle arteriolar dilation to acetylcholine is mediated by EDHF. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000; 278 (3): H762-8.
- (74) Kilburn, R.G., O.W. Griffith. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1992; 84 (11): 827-31.
- (75) Kelm, M., J. Schrader. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ. Res.* 1990; 66: 1561-1575.
- (76) Schulz, R., E. Nava, S. Moncada. Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105 (3): 575-80.
- (77) Radomski, M.W., R.M.J. Palmer, S. Moncada. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 100043-10047.
- (78) Brady, A.J., J.B. Warren, P.A. Poole-Wilson, T.J. Williams, S.E. Harding. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am. J. Physiol.* 1993; 265 (1 Pt 2): H176-82.
- (79) Shieh, P., M. Zhou, D.A. Ornan, I.H. Chaudry, P. Wang. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide occurs later than the onset of the hyperdynamic response during sepsis. *Shock.* 2000; 13 (4): 325-9.
- (80) Ochoa, J.B., A.O. Udekwu, T.R. Billar, R.D. Curran, F.B. Cerra, R.L. Simmons, and A.B. Peitzman. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann. Surg.* 1991; 214: 621-626.
- (81) McDonough, K.H., T. Smith, K. Patel, M. Quinn. Myocardial dysfunction in the septic rat heart: role of nitric oxide. *Shock.* 1998; 10 (5): 371-6.

- (82) Brady, A.J.B., P.A. Poole-Wilson, S.E. Harding, J.B. Warren. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H1963-H1966.
- (83) Stein, B., P. Frank, W. Schmitz, H. Scholz, M. Thoenes. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996; 28: 1631-1639.
- (84) Finkel, M.S., C.V. Oddis, T.D. Jacob, S.C. Watkins, B.G. Hattler, R.L. Simmons. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-389.
- (85) Avontuur, J.A., R.P. Tutein Nolthenius, J.W. van Bodegom, H.A. Bruining. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Crit. Care. Med.* 1998; 26 (4): 660-7.
- (86) Bernard, G.R., H.D. Reines, P.V. Halushka, S.B. Higgins, C.A. Metz, B.B. Swindell, P.E. Wright, F.L. Watts, J.J. Vrabanac. Prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> formation is increased in human sepsis syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 1095-1101.
- (87) Joris, I, G. Majno, E.J. Corey, R.A. Lewis. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E<sub>4</sub>. *Am. J. Pathol.* 1987; 26: 19-24.
- (88) Roth, D.M., D.J. Lefer, C.E. Hock, A.M. Lefer. Effects of peptide leukotrienes on cardiac dynamics in rat, cat and guinea pig hearts. *Am. J. Physiol.* 1985; 249: H477-H484.
- (89) Lee, C.C., R.F. Appleyard, J.G. Byrne, L.H. Cohn. Leukotriene D<sub>4</sub> and E<sub>4</sub> produced in myocardium impair coronary flow and ventricular function after two hours of global ischemia in rat heart. *Cardiovasc. Res.* 1993; 27: 770-773.

- (90) Sibelius, U., U. Grandel, M. Buerke, D. Mueller, L. Kiss, H.J. Kraemer, R. Braun-Dullaes, W. Haberbosch, W. Seeger, F. Grimminger. Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation*. 2000; 101 (1): 78-85.
- (91) Casnocha, S.A., S.G. Eskin, E.R. Hall, L.V. McIntire. Permeability of human endothelial monolayers: effect of vasoactive agonists and cAMP. *J. Appl. Physiol*. 1989; 67: 1997-2005.
- (92) Langelier, E.G., V.M. van Hinsbergh. Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelia cell monolayers: role of cAMP. *Am. J. Physiol*. 1991; 260: C1052-C1059.
- (93) Seeger, W., H. Wolf, G. Stahler, H. Neuhof, L. Roka. Increased pulmonary vascular resistance and permeability due to arachidonate metabolism in isolated rabbit lungs. *Prostaglandins*. 1982; 23 (2): 157-73.
- (94) Maclouf, J., A. Sala, G. Rossoni, F. Berti, R. Muller-Peddinghaus, G. Folco. Consequences of transcellular biosynthesis of leukotriene C<sub>4</sub> on organ function. *Haemostasis*. 1996; 26 Suppl 4: 28-36.
- (95) Matsumoto, Y., Y. Noguchi, J. Inui. Effect of Y-20811, a thromboxane A<sub>2</sub> synthetase inhibitor, on the arachidonic acid-induced response in the blood-superfused canine coronary artery. *Nippon. Yakurigaku. Zasshi*. 1994; 103 (2) : 59-66.
- (96) Takayasu-Okishio, M., Z. Terashita, K. Kondo. Endothelin-1 and platelet activating factor stimulate thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis in rat vascular smooth muscle cell. *Biochem. Pharmacol*. 1990; 40: 2713-2717.
- (97) Natanson, C., R.L. Danner, R.J. Elin, J.M. Hosseini, K.W. Peart, S.M, Banks, P.W., T.J. McVittie, R.I. Walker, J.E. Parrillo. Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. Escherichia coli and Staphylococcus aureus challenges in a canine model of human septic shock. *J. Clin. Invest*. 1989; 83 (1): 243-251.

- (98) Middelveld, R.J., K. Alving. Synergistic septicemic action of the gram-positive bacterial cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid in the pig in vivo. *Shock*. 2000; 13 (4): 297-306.
- (99) De Kimpe, S.J., M. Kengatharan, C. Thiernemann, J.R. Vane. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92 (22): 10359-63.
- (100) Danner, R.L., C. Natanson, R.J. Elin, J.M. Hosseini, S. Banks, T.J. McVittie, J.E. Parrillo. *Pseudomonas aeruginosa* compared with *Escherichia coli* produces less endotoxemia and mortality in a canine model of septic shock. *Chest* 1990; 98: 1480-1487.
- (101) Endo, S., K. Inada, Y. Inoue, Y. Kuwata, M. Suzuki, H. Yamashita, S. Hoshi, M. Yoshida. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ. Shock*. 1992; 38 (4): 264-74.
- (102) Hurley, J.C.. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8 (2): 268-92.
- (103) Casey, L.C., R.A. Balk, R.C. Bone. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann. Intern. Med.* 1993; 119 (8): 771-8.
- (104) Suffredini, A.F., R.E. Fromm, M.M. Parker, M. Brenner, J.A. Kovacs, J.E. Parrillo. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321: 280-287.
- (105) Natanson, C., P.W. Eichenholz, R.L. Danner, P.Q. Eichhacker, W.D. Hoffman, G.C. Kuo, S.M. Banks, T.J. McVittie, J.E. Parrillo. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs stimulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 823-832.

- (106) McDonough, K.H., B.A. Brumfield, C.H. Lang. In vitro performance after lethal and nonlethal doses of endotoxin. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: H240-H246.
- (107) Rubin, L.J., R.S. Keller, J.L. Parker, H.R. Adams. Contractile dysfunction of ventricular myocytes isolated from endotoxemic guinea pigs. *Shock.* 1994; 2 (2): 113-20.
- (108) Thompson, M., A. Kliewer, D. Maass, L. Becker, D.J. White, D. Bryant, G. Arteaga, J. Horton, B.P. Giroir. Increased cardiomyocyte intracellular calcium during endotoxin-induced cardiac dysfunction in guinea pigs. *Pediatr. Res.* 2000; 47 (5): 669-76.
- (109) Kengatharan, K.M., S. de Kimpe, C. Robson, S.J. Foster, C. Thiemermann. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J. Exp. Med.* 1998; 188 (2): 305-15.
- (110) Tsuneyoshi, I., Y. Kanmura, N. Yoshimura. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* depresses contractile function of human arteries in vitro due to the induction of nitric oxide synthase. *Anesth. Analg.* 1996; 82 (5): 948-53.
- (111) Kengatharan, K.M., S.J. de Kimpe, C. Thiemermann. Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury in a rodent model of gram-positive shock. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119 (7): 1411-21.
- (112) Vallejo, J.G., C.J. Baker, M.S. Edwards. Roles of the bacterial cell wall and capsule in induction of tumor necrosis factor alpha by type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 1996; 64 (12): 5042-6.
- (113) Bhakdi, S., H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, U. Weller, M. Kehoe, M. Palmer. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch. Microbiol.* 1996; 165: 73-79.

- (114) Bhakdi, S. and J. Traum-Jensen. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol.Rev.* 1991; 55 (4): 733-751.
- (115) Valeva, A., J. Pongs, S. Bhakdi, M. Palmer. Staphylococcal alpha-toxin: the role of the N-terminus in formation of the heptameric pore - a fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1325 (2): 281-6.
- (116) Suttorp, N., W. Seeger, E. Dewein, S. Bhakdi, L. Roka. Staphylococcal alpha-toxin induced PGI<sub>2</sub>-production in endothelial cells: role of calcium. *Am. J. Physiol.* 1985; 248 (1 Pt 1): C127-34.
- (117) Seeger, W., R.G. Birkemeyer, L. Ermert, N. Suttorp, S. Bhakdi, H.R. Duncker. Staphylococcal alpha-toxin induced vascular leakage in rabbit lungs. *Lab. Invest.* 1990; 63: 341-349.
- (118) Harshman, S., P.L. Lefferts, J.R. Snapper. Staphylococcal alpha toxin: a study with chronically instrumented awake sheep. *Infect. Immun.* 1992; 60 (9): 3489-3496.
- (119) Adamo, P., P.B. Taylor, H.B. Fackrell. Staphylococcal alpha toxin induced cardiac dysfunction. *Can. J. Cardiol.* 1989; 5 (8): 395-400.
- (120) Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux. Structure of Staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science.* 1996; 274: 1859-66.
- (121) Gouaux, J.E., O. Braha, M.R. Hobaugh, L. Song, S. Cheley, C. Shustak, H. Bayley. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91 (26): 12828-31.
- (122) Valeva, A., A. Weisser, B. Walker, M. Kehoe, H. Bayley S. Bhakdi, and M. Palmer. Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *EMBO-J.* 1996; 15 (8): 1857-1864.

- (123) Suttorp, N., T. Hessz, W. Seeger, A. Wilke, R. Koob, F. Lutz, D. Drenckhahn. Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro. *Am. J. Physiol.* 1988; 255: C368-C376.
- (124) May, A.K., R.G. Sawyer, T. Gleason, A. Whitworth, T.L. Pruett. In vivo cytokine response to Escherichia coli alpha-hemolysin determined with genetically engineered hemolytic and nonhemolytic E. coli variants. *Infect. Immun.* 1996; 64 (6): 2167-71.
- (125) Welch, R.A., E.P. Dellinger, B. Minshew, S. Falkow. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal E. coli infections. *Nature.* 1981; 294 (5842): 665-7.
- (126) May, A.K., T. Gleason, R.G. Sawyer, T.L. Pruett. Contribution of Escherichia coli alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infect. Immun.* 2000; 68 (1): 176-83.
- (127) Bhakdi, S., N. Mackman, G. Menestrina, L. Gray, F. Hugo, W. Seeger, I.B. Holland. The hemolysin of Escherichia coli. *Eur. J. Epidemiol.* 1988; 4 (2) : 135-43.
- (128) Grimminger, F., D. Walmrath, R.G. Birkemeyer, S. Bhakdi, W. Seeger. Leukotriene and hydroxyeicosatetraenoic acid generation elicited by low doses of Escherichia coli hemolysin in rabbit lungs. *Infect. Immun.* 1990; 58 (8): 2659-63.
- (129) Grimminger, F., M. Thomas, R. Obernitz, D. Walmrath, S. Bhakdi, W. Seeger. Inflammatory lipid mediator generation elicited by viable hemolysin-forming Escherichia coli in lung vasculature. *J. Exp. Med.* 1990; 172 (4): 1115-25.
- (130) Suttorp, N., B. Floer, H. Schnittler, W. Seeger, S. Bhakdi. Effects of Escherichia coli hemolysin on endothelial cell function. *Infect. Immun.* 1990; 58 (11): 3796-801.
- (131) Eberspächer, B., F. Hugo, S. Bhakdi. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin. *Infect. Immun.* 1989; 57: 983-88.

- (132) Langendorff, O.. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv der gesamten Physiologie*. 1895; 61: 291-332.
- (133) Hiller, K.H., P. Adami, S. Voll, F. Roder, P. Kowallik, W.R. Bauer, A. Haase, G. Ertl. In vivo colored microspheres in the isolated rat heart for use in NMR. *Mol. Cell. Cardiol*. 1996; 28: 571-77.
- (134) Kowallik, P., R. Schulz, B.D. Guth, A. Schade, W. Paffhausen, R. Groß, G. Heusch. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation*. 1991; 83: 974-82.
- (135) Hakkinen, J.P., M.W. Miller, A.H. Smith, D.R. Knight. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc.Res*. 1995; 29: 74-79.
- (136) Walland, A., H. Weihs, E. Mutschler. Perfusion pressure and transmural flow distribution in the left ventricles of isolated rat hearts. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1993; 20 (11): 723-9.
- (137) Malik, A.B., J.E. Kaplan, T.M. Saba. Reference sample method for cardiac output and regional blood flow determinations in the rat. *J.Appl.Physiol*. 1976; 40: 472-75.
- (138) Garlick, P.B., G.D. Mashiter, V. Di Marzo, J.R. Tippins, H.R. Morris, M.N. Maisey. The synthesis, release and action of leukotrienes in the isolated, unstimulated, buffer-perfused rat heart. *J.Mol.Cell.Cardiol*. 1989; 21 (11): 1101-10.
- (139) Grimminger, F., F. Rose, U. Sibelius, M. Meinhardt, B. Potzsch, R. Spriestersbach, S. Bhakdi, N. Suttorp, W. Seeger. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J.Immunol*. 1997; 159 (4): 1909-16.
- (140) Keller, A.M., R.M. Clancy, M.L. Barr, C.C. Marboe, P.J. Cannon. Acute reoxygenation injury in the isolated rat heart: role of resident cardiac mast cells. *Circ.Res*. 1988; 63 (6): 1044-52.

- (141) Grimminger, F., C. Scholz, S. Bhakdi, W. Seeger. Subhemolytic doses of *Escherichia coli* hemolysin evoke large quantities of lipoxygenase products in human neutrophils. *J.Biol.Chem.* 1991; 266: 14262.
- (142) Holtz, J., W.A. Grunewald, R. Manz, W. von Restorff, E. Baßenge. Intracapillary hemoglobin oxygen saturation and oxygen consumption in different layers of the left ventricular myocardium. *Pflugers Arch.* 1977; 370 (3): 253-8.
- (143) Kleinman, W.M., S.M. Krause, M.L. Hess. Differential subendocardial perfusion and injury during the course of gram-negative endotoxemia. *Adv.Shock.Res.* 1980; 4: 139-52.
- (144) Sibelius, U., U. Grandel, M. Buerke, L. Kiss, P. Klingenberger, M. Heep, E. Bournelis, W. Seeger, F. Grimminger. Leukotriene mediated coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility evoked by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in perfused rat hearts. *Submitted (Am.J.Resp.and Critical Care).*

## **10 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger für die Überlassung des interessanten Themas sowie Herrn Prof. Dr. M. Diener für die gewissenhafte Vertretung der Arbeit auf veterinärmedizinischer Seite. Herrn Dr. Ulf Sibelius danke ich für die Bereitstellung der umfangreichen Laboreinrichtung und seine kompetente fachliche Beratung. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Grandel für seine intensive und kompetente Betreuung und die immer angenehme Arbeitsatmosphäre. Frau Tina Heep danke ich für die praktische Hilfe im Labor.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die großzügige finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.